ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 2 Fascicule 4. 1981

LABORATOIRE DE CRYPTOGAMIE
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
12 RUE DE BUFFON, 75005 PARIS



PUBLICATION TRIMESTRIELLE SUBVENTIONNÉE PAR LE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

SOMMAIRE

Les manuscrits doivent être adressés à Madame M.F. ROQUEBERT, Laboratoire de Cryptogamie, 12 rue de Buffon, 75005 Paris.

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 2 Fascicule 4. 1981

Ancienne Revue de Mycologie. Dirigée par Roger HEIM

DIRECTEUR DE LA PUBLICATION : Madame J. NICOT.

ADMINISTRATION : Mme LOCQUIN-LINARD M. et M. ZAMBETTAKIS Ch.

SECRÉTAIRE DE RÉDACTION : Mme M.F. ROQUEBERT. ÉDITEUR : A.D.A.C.





CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

CONTENTS

(Tome 2, Fasc. 4, 1981)

FACTORS AFFECTING GROWTH and SCLEROTIAL FORMATION OF *SCLEROTINIA MINOR* IN VITRO

par K.B. KHARE[1], G. BOMPEIX[2] and K.C. BASUCHAUDARY[3]

ABSTRACT. — Growth and sclerotial formation of three isolates of *Sclerotinia minor* were excellent on PDA, Carrot-agar, Glucose-NH_4NO_3-agar with Iron-minor element and Glucose-peptone-agar. Of the synthetic and semi-synthetic media tested, Glucose-peptone was optimal for growth and sclerotial formation. *S. minor* grew and produced sclerotia over a wide range of pH (2.5-8.0). An optimum pH of 4.0 was obtained for growth and sclerotial formation both in buffered and unbuffered media. The temperature range for good vegetative growth and sclerotial formation was from 15 to 26°C with an optimum at the latter temperature. At the maximum temperature of 30°C only vegetative growth occured. At 15°C sclerotia tend to unite and to become irregular and flattened, smaller than those produced at 25°C.

RÉSUMÉ. — La croissance mycélienne et la formation des sclérotes de trois isolats de *Sclerotinia minor* sont excellentes sur PDA, Carotte-agar, Glucose-NH_4NO_3-agar avec le fer comme microélément, et Glucose-peptone-agar. Ce dernier était le meilleur milieu parmi tous ceux qui ont été testés qu'ils soient synthétiques ou semi-synthétiques. *S. minor* croît et produit des sclérotes dans une large gamme de pH (2,5-8). Un optimum de pH 4,0 est obtenu pour la croissance et la formation des sclérotes en milieux tamponnés ou non. Les températures favorables à la croissance mycélienne et à la formation des sclérotes se situent entre 15 et 26°C avec un optimum à cette dernière température. A la température maximale de 30°C on observe seulement une faible croissance végétative. A 15° les sclérotes tendent à s'aggréger et prennent une forme plate à bords irréguliers. Leurs dimensions sont inférieures à celles des sclérotes obtenus à 25°C.

---

1. Department of Crop Science, University of Nairobi, Nairobi, Kenya.

2. Laboratoire de Pathologie Végétale, Université Pierre et Marie Curie, T 53, Paris, France.

3. Department of Mycology and Plant Pathology, Banaras Hindu University, Varanasi, India.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptog., Mycol.),* TOME 2 (1981).

INTRODUCTION

The occurrence of this small sclerotial fungus was first observed on lettuce in Massachusets by SMITH (1900) who considered it as a degenerate form of *Sclerotinia libertiana* Fuckel (= *S. sclerotiorum* (Lib.) De Bary). JAGGER (1920) studied various isolates of this fungus on the same host and described them as a new species, *Sclerotinia minor*. The pathogen has since been reported to occur on a number of plants (VIENNOT-BOURGIN, 1949; WALKER, 1952; SACKSTON, 1956; SALERNO, 1959; RAINBOW, 1970, etc...). *S. minor* Jagger has been considered to be a synonym of *S. sclerotiorum* (Lib.) De Bary by some authors (PURDY, 1955; WALKER, 1969; MORRALL et al., 1972). However, recent studies based on patterns of mycelial growth, sclerotial ontogeny, their soluble proteins and isoenzymes showed *S. minor* and *S. sclerotiorum* to be distinct from each other (cf. WILLETTS and WONG, 1971; WILLETTS, 1972; WONG and WILLETTS, 1973). In France, the pathogen has been found severely attacking lettuce crops, particularly in the regions of the eastern Pyrénées where losses up to 80 % have been recorded (WAFFELAERT, 1969).

Since the physiology of *S. minor* has not been previously investigated, with the exception of CHIVERS (1929), on the effect of temperature on the size of sclerotia, MARRAS (1961), the effect of temperature and pH on growth on carrot-agar and LOUVET and BULIT (1964), on the influence of different concentration of CO_2 on growth, the present work was undertaken to study nutritional requirements and various factors affecting growth and sclerotial formation of the pathogen. However, only results of the effect of different media, pH and temperature are reported in this paper.

MATERIALS AND METHODS

The three isolates of *S. minor* used in this investigation were originally isolated from diseased sunflower (Iran), lettuce (France) and lucerne (U.S.A.), and have been referred to as Sm-S, Sm-LT and Sm-LC, respectively. The first two isolates were obtained through the courtesy of Prof. G. VIENNOT-BOURGIN and the third one was kindly arranged for us by Prof. L.H. PURDY. Stock cultures used were maintained on PDA at 4°C and were transferred regularly at intervals of two months.

Isolates were grown on ten natural and synthetic solid media (20 ml/plate) prepared according to the formulae given by HAWKER (1950) except Glucose-NH_4NO_3-Iron-minor element (abbreviated as GAIME) and COON's medium which had the following compositions per litre of distilled water, GAIME : Glucose, 20.0g – NH_4NO_3, 1.0g – KH_2PO_4, 1.0g – $MgSO_4$ 7 H_2O, 0.5g – $FeSO_4$ 7 H_2O, 2 mg – $ZnSO_4$ 7 H_2O, 2mg – $CaSO_4$ 2 H_2O, 2 mg – $CuSO_4$ 5 H_2O, 1mg – $MnSO_4$ H_2O, 0.2mg – Na_2MoO_4 2 H_2O, 0.2mg; COON's medium : Maltose 3.5g – KH_2PO_4, 1.25g – $MgSO_4$ 7 H_2O, 0.5g – Asparagine

0.25g. Colony growth (average of two) and visual observation on sclerotial formation of each isolate were recorded on the third, fifth and tenth day after inoculation and incubated at 24 ± 2°C in continuous artificial light. The growth in terms of dry weight and sclerotial formation were compared on seven synthetic liquid media also. Isolates were grown on these media under similar conditions for 21 days.

The effect of pH on growth was studied both in unbuffered and buffered glucose-peptone medium (citrate-phosphate buffer : 0.01 M citric acid and 0.02 M disodium hydrogen phosphate, pH 2-8, with 0.5 of intervals). Isolates were grown on different pH at 25°C for 17 days in a stationary condition.

The effect of temperature on growth and sclerotial formation was investigated on PDA (20 ml/plate), incubated at various temperatures ranging from 0-35°C in dark. Visual observations on the degree of sclerotial formation, as in all the experiments, were empirically rated as nil, scanty, moderate or abundant (see table 1). Isolates were also grown in glucose-peptone medium at 5-30°C and incubated for 17 days under the same condition.

250 ml Pyrex Erlenmeyer flasks, each containing 50 ml of liquid medium were sterilized for 15 minutes at 115°C and inoculated with a 4 mm mycelial disc cut from the advancing margin of a 4 days old culture grown on PDA at 20°C. Experiments were run in triplicates. Unless otherwise mentioned, the pH of the media were adjusted to 6.0 with NaOH or HCl prior to autoclaving (recorded as initial pH) and at the end of incubation period.

Mycelial mats and sclerotia were harvested by filtration with suction through «Millipore» filter discs which had been previously dried to constant weight at 80°C. Filtrates from the replicates were mixed and the pH values were determined. Mycelium and sclerotia were thoroughly washed with distilled water, dried at 80°C for 24 hrs and weighed.

RESULTS

Effect of natural and synthetic / or semi-synthetic media

PDA, carrot-agar, malt-agar, glucose-peptone-agar and GAIME all provided very good growth and sclerotial formation of the three isolates (Table 1). The growth and the sclerotial formation was moderate in CZAPEK-DOX and RICHARDS'S agar, and poor growth with a few mature sclerotia occurred in ASTHANA and HAWKER's, BROWN's and COON's agar. However, sunflower isolate could not produce even a single sclerotium in ASTHANA and HAWKER's agar up to 10 days and lucerne isolate produced only few immature slcerotia in BROWN's agar. These isolates, however, produced moderate to abundant sclerotia on other media.

Isolates when grown in different synthetic and semi-synthetic media, produced maximum growth in glucose-peptone (Table 2). Good growth with abun-

Media	Initial pH	Sclerotia	Sm-LC			Sm-LT			Sm-S		
			3d	5d	10d	3d	5d	10d	3d	5d	10d
Asthana & Hawker's	5,7	immature	0 (60)*	0	0	0 (47)	+	0	0 (34)	0	0
		mature	0	0	+	0	0	+	0	0	0
Brown's	6,0	immature	0 (32)	0	+	0 (29)	+	0	0 (32)	0	0
		mature	0	0	0	0	0	+	0	0	0
Carrot - agar	5,8	immature	0 (62)	+++	0	0 (54)	+++	0	0 (47)	++	0
		mature	0	0	+++	0	0	+++	0	0	++
Coon's	5,9	immature	0 (32)	+	0	0 (21)	+	+	0 (12)	0	0
		mature	0	0	+	0	0	+	0	0	+
Czapek - Dox	5,8	immature	0 (62)	0	0	0 (42)	+	++	0 (40)	0	0
		mature	0	0	++	0	0	+	0	0	++
Glucose NH_4NO_3	5,7	immature	0 (60)	+	0	0 (45)	++	0	0 (41)	0	0
		mature	0	0	+++	0	0	+++	0	0	++
Glucose - peptone	5,6	immature	0 (62)	+	0	0 (41)	++	0	0 (39)	+	+
		mature	0	0	+++	0	0	+++	0	0	++
Malt - agar	5,9	immature	0 (63)	+++	+++	0 (46)	++	0	0 (42)	+	0
		mature	0	0	+++	0	0	+++	0	0	++
PDA	5,7	immature	0 (82)	++	0	0 (59)	++	0	0 (57)	+++	0
		mature	0	0	+++	0	0	+++	0	0	+++
Richards	5,8	immature	0 (50)	0	0	0 (40)	+	0	0 (38)	0	0
		mature	0	0	++	0	0	+	0	0	++

Table 1. — Sclerotial formation of the three isolates of *S. minor* (+ scanty; ++ moderate; +++ abundant) with immature slcerotia (initials and discolored sclerotia) and mature sclerotia (black) and radial growth (in mm*) on different solid media at 24 ± 2°C in continuous artificial light (Average of three replicates).

After 5 to 10 days the fungus spreads on the entire surface of the Petri dishes with the exception of the ASTHANA and HAWKER's, and BROWN's media.

dant to moderate sclerotia occurred in GAIME followed by RICHARDS's and CZAPEK-DOX, and poor growth with a few slcerotia in ASTHANA and HAWKER's, BROWN's and COON's media. Of the three, lucerne isolate produced maximum growth in all the media. At the end of incubation period, pH of all the media moved downwards.

Table 2. — Average dry weight in mg of mycelium and sclerotia[1] obtained by three isolates of *Sclerotinia minor* in different liquid media after 21 days of incubation at 24 ± 2°C in continuous artificial light.

Media	initial pH	Sm-LC			Sm-LT			Sm-S		
		pH of filtr.	dry weight	scl	pH of filtr.	dry weight	scl	pH of filtr.	dry weight	scl
Asthana & Hawker's	5.7	3.4	37	+	5.5	8	0	3.5	25	+
Brown's	6.1	3.5	25	+	3.5	18	+	3.4	16	+
Coon's	5.8	5.6	10	+	5.5	11	+	4.2	21	+
Czapek-Dox	5.9	3.1	170	+++	3.2	154	+++	3.0	145	++
Glucose-NH_4NO_3	5.7	2.7	266	+++	2.8	222	+++	2.8	188	+++
Glucose-peptone	5.8	2.5	284	+++	2.6	228	+++	2.6	210	+++
Richards	5.8	3.0	178	+++	3.0	160	+++	3.2	131	++

1. Sclerotial formation : 0 nil, + scanty; ++ moderate; +++ abundant.

Effect of hydrogen-ion concentration

Table 3. — Effect of different pH on the growth[1] and sclerotial formation of three isolates of *S. minor* in buffered[2] and unbuffered liquid glucose-peptone medium after 17 days of incubation at 25°C in dark and stationary condition.

	Sm-LC						Sm-LT						Sm-S					
	unbuffered medium			buffered medium			unbuffered medium			buffered medium			unbuffered medium			buffered medium		
	dry wt.	pH filtr.	scl	dry wt.	pH filtr.	scl	dry wt.	pH filtr.	scl	dry wt.	pH filtr.	scl	dry wt.	pH filtr.	scl	dry wt.	pH filtr.	scl
2.0	2	2.2	0	4	2.1	0	2	2.1	0	0	2.0	0	0	2.0	0	3	2.0	0
2.5	124	2.4	++	150	2.4	++	82	2.4	+	100	2.5	++	60	2.5	+	84	2.5	+
3.0	266	2.8	+++	276	3.0	+++	226	3.0	+++	242	3.0	+++	168	2.9	++	202	3.0	++
3.5	278	3.0	+++	332	3.4	+++	245	3.1	+++	267	3.5	+++	179	3.1	+++	250	3.5	+++
4.0	287	3.1	+++	360	3.8	+++	276	3.0	+++	288	3.7	+++	191	3.2	+++	266	3.7	+++
4.5	272	3.0	+++	354	3.8	+++	260	3.0	+++	278	3.1	+++	185	3.0	+++	275	3.1	+++
5.0	268	3.0	+++	301	4.0	+++	190	2.9	+++	264	3.4	+++	162	3.0	+++	248	3.4	+++
5.5	248	3.0	+++	262	3.6	++	177	2.9	+++	243	3.8	++	140	3.0	++	224	3.8	++
6.0	224	2.6	+++	245	3.8	++	159	2.7	+++	227	3.2	++	140	3.0	++	165	3.2	++
6.5	192	2.8	++	218	3.6	+	136	2.8	++	198	3.5	+	127	2.9	++	128	3.1	+
7.0	175	3.2	++	110	4.2	+	79	2.6	+	108	4.1	+	101	2.8	+	83	4.1	+
7.5	110	3.2	+	16	7.5	0	62	3.2	+	12	7.5	0	44	3.3	+	11	7.5	0
8.0	82	4.2	+	12	7.9	0	51	3.4	+	10	8.0	0	18	4.4	+	[illegible]	8.0	0

1. Average dry weight of mycelium and sclerotia in mg.
2. Citrate-phosphate buffer (0.01 M solution of citric acid, 0.02 M solution of dibasic sodium phosphate).
3. Sclerotial formation (see table 2).

Results of this experiment indicate that all the three isolates of *S. minor* grew and produced sclerotia within a wide range of pH (2.5-8.0) in an unbuffered medium (Table 3). The isolates grew well and produced many sclerotia between pH 3.0-6.0. Maximum growth in all the three isolates occurred at pH 4.0. On both sides of this optimum pH the growth decreased although the decrease was more abrupt towards the alkaline side than on the acidic side.

On buffered medium too, pH 4.0 was observed optimum for growth of all the isolates, except sunflower isolate which produced maximum growth at pH 4.5. However, there was no significant difference in growth produced at pH 4.0 and 4.5 by all the three isolates. The buffering maintained the pH during growth only from 2.0 to 3.5 and at 7.5 and 8.0. The formation of sclerotia at pH 7.5 and 8.0 was poor in all the isolates, none being in the buffered medium. No growth and sclerotial formation was observed at pH 2.0 regardless of the medium.

Effect of temperature

Isolates grew well and produced abundant slcerotia between 15-26°C (Table 4). Less growth with fewer or no sclerotia occurred at 5 and 28°C in all the isolates, except lucerne isolate which produced sclerotia moderately at the latter temperature. The optimum and maximum temperatures for growth of all the isolates were found to be 26°C and 30°C. At 30°C no sclerotium formed in all the three isolates.

In the case of solid medium the colony growth in all the isolates was inhibited after seven and four days at 0 and 30°C respectively, and no sclerotial formation

Table 4. – Effect of different temperatures on growth[1] and sclerotial formation of three isolates of *S. minor* in glucose-peptone medium after 17 days of incubation in dark and stationary condition (initial pH, 5.9).

Temperature	Sm-LC			Sm-LT			Sm-S		
	pH of filtrate	dry weight	scl[2]	pH of filtrate	dry weight	scl	pH of filtrate	dry weight	scl
5	3.1	57	0	3.0	64	++	3.6	29	0
15	2.6	178	+++	2.9	144	+++	3.0	102	++
20	2.8	182	+++	2.7	192	+++	2.6	184	+++
22	2.7	226	+++	2.6	232	+++	2.7	188	+++
26	2.8	260	+++	2.[illegible]	271	+++	2.5	225	+++
28	3.3	94	++	4.2	28	0	3.7	21	0
30	5.6	2	0	5.7	3	0	5.8	0	0

1. Average of dry weight of mycelium and sclerotial of three replicates in mg.
2. Sclerotial formation (see table 2).

was observed at these temperatures even after 30 days. At 35°C all the three isolates failed to grow. At 5 and 15°C sclerotial initial formed in ten and eight days respectively towards the periphery but the maturation of sclerotia was much delayed. At lower temperatures (5-15°C) sclerotia tended to unite, becoming somewhat irregular and flattened. Their size, however, was smaller than those produced at 25°C.

DISCUSSION

The results show that growth and sclerotial formation of *S. minor* was comparatively better in natural media than in other media tested. Of the liquid media, glucose-peptone supported maximum growth with abundant sclerotial formation. During the growth of isolates, the pH of the medium decreased and this decrease may be perhaps due to production of organic acids in the culture by the fungus as reported in case of *S. sclerotiorum* (Lib.) De Bary by VEGA et al. (1970).

The suitable pH range, 3.0-6.0 and the optimum pH 4.0 for growth and sclerotial formation of *S. minor* are contrary to MARRAS (1961) who obtained good growth of the fungus between pH 4.0 and 10.0 with the optimum around 7.0 on carrot-agar. In this study the fungus grew very little at pH 8.0. Incidentally the low pH of 3.5-4.5 which favours maximum growth and abundant sclerotial formation of *S. minor*, is also the best for the production of proteolytic enzymes (KHARE and BOMPEIX, 1976).

The minimum, optimum and maximum temperatures for growth of *S. minor* were observed to be 0, 26 and 30°C respectively whereas MARRAS (1961) reported them to be 5, 20-25 and 30°C on carrot-agar. However, in the present study, at 5 and 30°C only vegetative growth was observed, which was inhibited after seven and four days of inoculation at these temperatures. The size of sclerotium at low temperature (5°C) was found to be smaller than those produced at 25°C. This is in agreement with CHIVERS (1929) who also observed smaller sized sclerotia at low temperature.

Since *S. minor* is considered either synonymous to *S. sclerotiorum* by some authors or distinct by others it is necessary to compare our results of the effect of temperature and pH on growth and sclerotial formation of *S. minor* with that available for *S. sclerotiorum* in literature. However, comparisons between results of *S. minor* in this study and that of *S. sclerotiorum* (TANRIKUT and VAUGHAN, 1951) are difficult because of different media, incubation period and temperature. Nevertheless differences are evident, *S. minor* could not produce sclerotia at 0 and 30°C, at pH 2.0, and suitable pH range being 3.0-6.0 whereas TANRIKUT and VAUGHAN (1951) and LETOURNEAU (1979) reported that *S. slcerotiorum* produced slcerotia at these temperatures and pH, and grew well over a pH range of 2.4-9.6. However, the optimum temperature for this fungus as reported here and that of MARRAS (1961), and for *S. sclero-*

tiorum observed by TANRIKUT and VAUGHAN (1951) is more or less the same.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Professor G. VIENNOT-BOURGIN, ex-Director of the Plant Pathology and Botany Laboratory, National Institute of Agronomy, Paris, for facilities, guidance and encouragement. The senior author acknowledges the awards of French Government Scholarship which enabled his to carry out this research in France.

REFERENCES

CHIVERS A.H., 1929 — A comparative study of *Sclerotinia minor* Jagger and *Sclerotinia intermedia* Ramsey in culture. *Phytopathology* 19 : 301-309.

HAWKER L.E., 1950 — Physiology of Fungi. 360 pp. *Univ. Press*, London.

JAGGER I.C., 1920 — *Sclerotinia minor*, n. sp., the cause of a decay of lettuce, celery and other crops. *J. Agric. Res.* 20 : 331-334.

KHARE K.B. and BOMPEIX G., 1976 — Activités protéolytiques des *Sclerotinia sclerotiorum* et *S. minor* : rôle possible lors de la pathogenèse. *Revue de Mycol.* 40 : 65-84.

LETOURNEAU D., 1979 — Morphology, Cytology and Physiology of *Sclerotinia* Species in Culture. *Phytopathology* 69 : 887-889.

LOUVET J. and BULIT J., 1964 — Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. I - Action du gaz carbonique sur la croissance et l'activité parasitaire de *Sclerotinia minor* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Annals. Epiphyt.* 15 : 21-44.

MARRAS F., 1961 — *Sclerotinia minor* Jagger parassita delle Leguminose (Pisello, Lenticchio, Cece e Fagiolo) in Sardegna. *Studi Sassaresi* 9 : 13 pp.

MORRALL R.A., DUCZEK L.J. and SHEARD J.W., 1972 — Variations and correlations within and between morphology, pathogenicity, and pectolytic activity in *Sclerotinia* from Saskatchewan. *Can. J. Bot.* 50 : 767-786.

PURDY L.H., 1955 — A broader concept of the species *Sclerotinia sclerotiorum* based on variability. *Phytopathology* 45 : 421-427.

RAINBOW A.F., 1970 — *Sclerotinia* disease in dwarf Tomatoes. *N. Z. Jl. Agric.* 121 : 58-62.

SACKSTON W.E., 1956 — Observations and speculations on rust (*Puccinia helianthi* Schw.) and some other diseases of sunflowers in Chile. *Plant Dis. Reptr.* 40 : 744-747.

SALERNO M., 1959 — *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary e *S. minor* Jagger, nuovi nemici della Patata precoce in Sicilia. *Notiz. Malatt. Piante* 49-50 : 137-141.

SMITH R.E., 1900 — *Botrytis* and *Sclerotinia*, their relation to certain plant diseases and to each other. *Bot. Gaz.* 29 : 369-407.

TANRIKUT S. and VAUGHAN E.K., 1951 — Studies on the physiology of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 41 : 1099-1103.

VEGA R.R., CORSINI D. and LETOURNEAU D., 1970 — Non volatile organic acids produced by *Sclerotinia sclerotiorum* in synthetic liquid media. *Mycologia* 62 : 332-338.

VIENNOT-BOURGIN G., 1949 — Les champignons parasites des plantes cultivées. Masson Cie, Paris, 1854 pp.

WAFFELAERT P., 1969 — Nouvelles perspectives de lutte contre les maladies provoquant la pourriture de la laitue. *Phytiat. Phytopharm.* 18 : 39-49.

WALKER J.C., 1952 — Diseases of vegetable crops. Mc Graw-Hill Book, New York and London, 529 pp.

WALKER J.C., 1969 — Plant Pathology. McGraw-Hill Book, New York and London.

WILLETTS H.J., 1972 — The morphogenesis and possible evolutionary origins of fungal sclerotia. *Biol. Rev.* 47 : 515-536.

WILLETTS H.J. and WONG A.L., 1971 — Ontogenetic diversity of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species. *Trans. Br. mycol. Soc.* 57 : 515-524.

WONG A.L. and WILLETTS H.J., 1973 — Electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Sclerotinia* species. *Trans. Br. mycol. Soc.* 61 : 167-178.

Étude ultrastructurale comparative du développement des ascospores chez la lignée sauvage et chez des mutants à ascospores «ceinturées» ou «albinos» de L'*ASCOBOLUS IMMERSUS* PERS. ex FR.

par A. BELLEMERE*, L. MELENDEZ-HOWELL**, A. NICOLAS*** et J.-L. ROSSIGNOL***

SUMMARY. – The chronology of ascospore development in *Ascobolus immersus* is specified for the wild-type and details are given about the associated ultrastructural modification of the epiplasm, sporoplasm and more particularly of the ascospore wall. A comparative study is performed on two strains with distinct mutations in the same gene (*b2*). One mutant strain gives «belted» ascospores (with a pigmented equatorial ring) and the other strain gives «albino» ascospores. It is confirmed that the pigmentation is late and very marked, and that it results from a modification in a preexisting layer of the wall, being simply a phenomenon allied with maturation. It is accompanied by the ultrastructural modification of a thin layer and, to a lesser degree, of the perispore of the ascosporal wall. It is linked with the nature of the lipidic globules of the sporoplasm and with the form and content of the perisporic vacuoles of the epiplasm. There are, besides, important ultrastructural transformations of the sporoplasm to be observed during the maturation process in the three strains studied ; the apparition of a characteristic zoning in the sporoplasm, changes in the form of the mitochondrial ridges, in their number and in their reaction to the Patag test (Thiéry's technique).

RÉSUMÉ. – La chronologie du développement des ascospores est précisée chez la lignée sauvage et des détails sont apportés sur les modifications ultrastructurales concomitantes de l'épiplasme, du sporoplasme, et plus particulièrement de la paroi ascosporale. Deux souches mutantes du même gène *b2* l'une «ceinturée» (ascospore à anneau équatorial pigmenté) et l'autre «albinos» ont été étudiées pour comparaison. Il est confirmé que la pigmentation est tardive, brutale, qu'elle résulte de la modification d'une couche préexis-

* Laboratoire de Mycologie, École Normale Supérieure de Saint-Cloud, Grille d'Honneur, Parc de St-Cloud, F 92211 Saint-Cloud Cedex, France.

** LA 257, CNRS, Laboratoire de Cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle, 12, rue de Buffon, 75005 Paris, France.

*** Laboratoire de Génétique, BCG, Bât. 400, LA 86, Université Paris-Sud, F 91405 Orsay-Cedex, France.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptog., Mycol.)*, TOME 2 (1981).

tante de la paroi et n'est qu'un phénomène annexe de la maturation. Elle s'accompagne de la modification ultrastructurale d'une mince couche et, dans une moindre mesure, de la périspore de la paroi ascosporale. Elle est en liaison avec les caractères des globules lipidiques du sporoplasme et avec la forme et le contenu des vacuoles épiplasmiques périsporiques. Par ailleurs, d'importantes transformations ultrastructurales du sporoplasme sont mises en évidence au cours de la maturation chez les trois lignées étudiées : apparition d'une zonation caractéristique du sporoplasme, modification de la forme des crêtes mitochondriales, de leur nombre et de leur réactivité au test Patag (technique de Thiéry).

INTRODUCTION

Chez le champignon Ascomycète hétérothallique *Ascobolus immersus* les mutations affectant les caractères morphologiques de l'ascospore ont été largement utilisées comme marqueurs génétiques dans les deux domaines suivants : le mécanisme de la recombinaison génétique au cours de la méiose (LISSOUBA et al., 1962; ROSSIGNOL et al., 1979), l'instabilité génétique (DECARIS et al., 1981). Pourtant, les modifications ultrastructurales liées à de telles mutations n'ont été étudiées que par DELAY (1966) chez un seul mutant albinos.

Désormais les conditions d'une étude exhaustive du développement des ascospores et de leur pigmentation se trouvent réunies dans le stock 28 d'*Ascobolus*. En effet, plus de 300 mutants affectés dans la morphologie des ascospores correspondant à 33 gènes ont été isolés (NICOLAS et al., 1981). Ces mutants sont affectés soit dans la forme ou dans la taille de l'ascospore (9 gènes) soit dans la pigmentation (24 gènes). Parmi ces derniers gènes, 19 contrôlent la couleur de l'ascospore et 5 la distribution de la pigmentation. Pourtant, dans certains gènes, des allèles mutants différents peuvent modifier les uns la couleur et les autres la distribution du pigment (NICOLAS et al., 1981). Au cours de cette première étude, la chronologie détaillée du développement des ascospores est précisée chez la lignée sauvage de référence qui présente des ascospores dont le pigment brun-rouge est uniformément réparti. Pour comparaison deux allèles mutants du gène *b2* ont été étudiés; l'un dont les ascospores sont non pigmentées (albinos); l'autre présentant des ascospores à anneau équatorial pigmenté (ceinturé).

I. – MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. - CARACTERES GÉNÉTIQUES DES SOUCHES ÉTUDIÉES ET MILIEUX DE CULTURE

Les souches utilisées appartiennent au stock 28 d'*Ascobolus immersus* (RIZET et al., 1969) (Pl. I).

Le mutant «albinos» *b2* A4 (mutation A4 dans le gène *b2*) et le mutant

«ceinturé» *b2* E1E2 ont été isolés par LEBLON (1972). Le développement des spores sauvages, albinos et ceinturées a été étudié dans des croisements respectivement «sauvage» par «sauvage», «albinos» par «albinos» et «ceinturé» par «ceinturé». Le cycle de ce champignon a été décrit par ZICKLER (1973). Les milieux de culture utilisés sont ceux décrits par RIZET et al. (1960). Les croisements sont effectués à 22°C sur du crottin de cheval stérilisé.

B. - TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

Durant la période de maturation des asques plusieurs fructifications ascosporées sont prélevées chaque jour à divers emplacements dans des boîtes de cultures provenant d'un même ensemencement. Ces fructifications sont fixées et incluses selon les techniques classiques en microscopie électronique par transmission : fixation par le glutaraldéhyde, post-fixation par le tétroxyde d'osmium, déshydratation par l'éthanol, inclusion dans une résine synthétique selon SPURR 1969 (cf. BELLEMERE et MELENDEZ-HOWELL, 1976).

Les coupes réalisées au moyen d'un ultramicrotome Reichert OMU_2 sont ensuite préférentiellement soumises au test de THIERY (ou réaction Patag) qui révèle certains polysaccharides (THIERY, 1967). La technique de REYNOLDS à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb a également été utilisée (REYNOLDS, 1963). Les grilles sont examinées par transmission à l'aide d'un microscope électronique JEOL JEM7 sous tension de 80 kV.

Un nombre relativement élevé de fructifications a dû être observé car les apothécies de l'*Ascobolus immersus* ne contiennent en effet qu'un petit nombre d'asques en maturation (4 ou 5) dont l'âge diffère et dont les ascospores ne sont pas toutes exactement au même stade de développement. Par suite une coupe dans une fructification d'âge convenable peut ne pas renfermer d'ascospores parvenues à un stade de développement déterminé ou n'en contenir qu'un nombre très réduit. De nombreuses sections d'apothécies ont donc été nécessaires pour reconstituer la chronologie fine du développement des ascospores.

De plus les asques de l'*Ascobolus immersus* sont disposés en bouquet et leurs ascospores ne sont pas unisériées. Pour obtenir des coupes d'ascospores et d'asques aussi exactement longitudinales que possible en vue d'une étude précise des parois, il est donc nécessaire, au cours de la réalisation des sections, que l'orientation des apothécies qui a été soigneusement faite au moment de l'inclusion soit légèrement corrigée et cela de façon permanente.

Par ailleurs la paroi des ascospores âgées tend à se cliver longitudinalement au cours des sections ultrafines. Sa partie extérieure ne subit pas de dommages mais sa partie intérieure se plisse et se détériore gravement, ainsi que le sporoplasme, dont elle reste solidaire, bien que la fixation de ce dernier paraisse convenable. Il a donc été difficile d'obtenir des coupes satisfaisantes d'ascospores âgées. L'augmentation de concentration du fixateur et l'allongement du temps de fixation n'ont pas apporté d'amélioration notable.

Le repérage des stades de développement précis des ascospores n'est pas immédiat et demande quelques manipulations. On ne peut, pour un repérage grossier, utiliser l'importance de la paroi externe de la spore (périspore) car elle varie considérablement selon que les spores sont isolées, qu'elles sont en contact étroit, ou qu'elles sont proches ou non de la paroi ascale. L'usage d'un fort grandissement du microscope est donc nécessaire. Comme les spores sont volumineuses, la recherche d'un stade de développement précis demande en général des déplacements relativement importants des préparations.

II. – RÉSULTATS

La comparaison du développement des ascospores chez les trois lignées étudiées ici repose fondamentalement sur l'établissement d'une chronologie de ce développement. D'après le schéma désormais classique chez les Ascomycètes supérieurs (DELAY, 1966; SCHRANTZ, 1966, 1970; CARROLL, 1967; REEVES, 1967; OSO, 1969; WELLS, 1972; MERKUS, 1973-1976) le développement d'une ascospore après son individualisation à partir de la vésicule ascale peut être subdivisé dans ses grandes lignes en cinq étapes, définies simplement d'après la structure de la paroi ascosporale :

1) le **stade primordial**, où la paroi de l'ascospore, extrêmement mince, en apparence homogène, a une surface onduleuse,

2) le **stade primaire**, où cette paroi, toujours homogène, s'épaissit et cesse d'être onduleuse,

3) le **stade secondaire**, à partir duquel la paroi, encore plus épaisse, comporte deux couches distinctes,

4) le **stade tertiaire**, où l'on observe dans la paroi au moins trois couches nettement distinctes,

5) le **stade de maturation**, moins facile à définir par le seul critère de la structure pariétale, durant lequel la paroi se modifie notablement, avec souvent, mais pas nécessairement, une forte différenciation d'une partie de la couche externe de la paroi.

Ces cinq étapes s'observent à la fois chez la lignée sauvage et chez les mutants ceinturé ou albinos.

Des détails plus fins de l'ultrastructure de la paroi ascosporale et aussi du sporoplasme et de l'épiplasme doivent être pris en considération pour établir des subdivisions à l'intérieur des stades définis ci-dessus.

Cependant l'établissement d'une chronologie fine au développement des ascospores est rendue très délicate par l'absence de synchronisme strict dans les modifications ultrastructurales des diverses parties de l'ascospore au cours de son développement. De multiples observations n'ont pas toujours permis de lever les ambiguités présentées à cet égard par certaines figures.

Afin de permettre dans l'avenir la comparaison éventuelle avec d'autres mutants la lignée sauvage a été prise comme référence en vue de l'établissement

de la chronologie de base du développement des ascospores. Le développement des ascospores chez les mutants ceinturé et albinos sera étudié dans la suite. Seuls les éléments spécifiques de ce développement feront l'objet d'un commentaire détaillé.

Le schéma de la Fig. 1 explicite la terminologie utilisée dans l'étude de la paroi ascosporale.

Fig. 1. — Positions relatives des éléments structuraux constitutifs de la paroi de l'ascospore de l'*Ascobolus immersus*. Schéma repère, théorique.

A. - CHRONOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT DES ASCOSPORES DE LA LIGNÉE SAUVAGE

1) Stade primaire (Pl. II).

Les ascospores qui viennent de s'individualiser à partir de la vésicule ascale (stade primordial) ont une paroi très mince, homogène, transparente aux électrons, limitée du côté interne par le plasmalemme ascosporal et du côté externe par une autre membrane trilaminaire qui, par commodité, sera appelée ici «**limitante externe**» de l'ascospore.

Au cours du stade primaire du développement la **paroi ascosporale** s'épaissit notablement mais reste homogène et transparente aux électrons (Pl. II-A). La limitante externe et le plasmalemme sporal, très sinueux, sont soulignés par la réactivité de leur partie moyenne au test Patag (Pl. II-B).

Le **sporoplasme** (Pl. II-C) renferme des mitochondries à crêtes peu nombreuses, un peu verruqueuses; le reticulum endoplasmique, un peu plus abondant près du plasmalemme, montre des sections courtes, d'aspect souvent contourné; des microvésicules sont présentes; les granules de glycogène sont dispersés; les globules lipidiques sont très rares ainsi que les vacuoles qui sont toujours très petites et correspondent probablement à des mitochondries en régression. Le noyau sporal central, subglobuleux, possède une membrane abondamment fenestrée (Pl. II-C).

Les caractères cytologiques de l'**épiplasme** (Pl. II-A, C) sont encore proches de ceux du sporoplasme. Les mitochondries sont analogues; quelques-unes présentent un aspect en haltère (Pl. II-D). Le reticulum endoplasmique est abondant, souvent d'aspect vésiculeux; certains de ses éléments, assez épais, sont fréquemment disposés parallèlement à la limitante externe, au voisinage de celle-ci (Pl. II-B). Les globules lipidiques sont totalement absents. Les vacuoles sont par contre relativement nombreuses mais encore de faible taille. A un stade avancé le glycogène devient abondant et commence à former des amas (Pl. II-B).

Le plasmalemme ascal, Patag +, montre çà et là, des corps paramuraux. La paroi de l'asque comporte une partie externe (exoascus), mince, Patag + et une partie interne (endoascus) beaucoup plus épaisse, à peine réactive au test Patag, dans laquelle on distingue avec difficulté trois couches à peine différenciées (Pl. II-A).

2) Stade secondaire (Pl. III).

Au cours de ce stade, la **paroi ascosporale**, qui continue à s'épaissir, perd son homogénéité (Pl. III-A). On y distingue une partie interne, Patag – et une partie externe, faiblement Patag +, diversement dénommées par les auteurs (cf. BELLEMERE et MELENDEZ-HOWELL, 1976). On qualifiera ici la partie externe de «**périspore**» (terme habituellement utilisé par les auteurs) et, pour

éviter des confusions, on réservera le nom de «**paroi propre**» à la partie interne (appelée tantôt exospore et tantôt endospore par les auteurs).

Cette paroi propre (Pl. III-A) constitue l'essentiel de la paroi ascosporale; d'épaisseur régulière et d'aspect relativement homogène, elle est Patag –. La périspore relativement mince est faiblement Patag + et d'épaisseur très inégale. Elle forme çà et là, des hernies qui pénètrent l'épiplasme et confèrent à la jeune ascospore une surface onduleuse. Assez rapidement la périspore cesse d'être homogène. Seule une mince frange ou périspore externe, au contact de la limitante externe, conserve la texture initiale très finement granuleuse (Pl. III-B). La partie profonde de la périspore, qui est la plus importante, s'enrichit de granules polysaccharidiques et devient plus nettement Patag +; on l'appellera ici périspore moyenne (Pl. III). La périspore interne s'individualisera ultérieurement.

Tandis que la périspore se différencie, une «**paroi intermédiaire**» s'ébauche entre la périspore moyenne et la paroi propre de l'ascospore (Pl. III-A, B). Le terme de paroi intermédiaire a été préféré ici aux diverses dénominations utilisées par les auteurs (épispore, endospore, etc...) car il évite des confusions tout en indiquant de façon simple la localisation de cet élément de la paroi.

A l'origine la paroi intermédiaire n'est qu'une étroite bande Patag – occupée par de fines stries transversales, faiblement Patag +, mal délimitées, plus réactives dans leur partie basilaire. Bientôt une striation longitudinale, également imprécise et faiblement Patag +, se superpose, çà et là, à la striation transversale. Elle confère à la jeune paroi intermédiaire l'aspect d'un réseau, assez flou, plus ou moins incomplet, dont les mailles sont allongées parallèlement à la paroi de l'ascospore (Pl. III-B).

A ce stade les caractères cytologiques du **sporoplasme** se sont peu modifiés (Pl. III-D). Les mitochondries, un peu plus abondantes, ont des crêtes assez épaisses et irrégulières. Le reticulum endoplasmique est un peu plus développé mais son aspect reste inchangé. Les granules de glycogène, plus nombreux, forment maintenant de petits amas. Les globules lipidiques restent rares. Le noyau sporal est souvent lobé. Le plasmalemme est très sinueux.

Dans l'**épiplasme** (Pl. III-C) le reticulum endoplasmique est peu modifié: le glycogène est devenu dans l'ensemble plus abondant que dans le sporoplasme et forme des amas assez importants. Les vacuoles, également plus nombreuses, sont aussi généralement plus grandes; certaines d'entre elles, situées surtout dans la région apicale de l'asque sont étroitement appliquées contre la limitante externe de l'ascospore (Pl. III-B) et peuvent se fusionner latéralement. Par suite, à ce stade, la spore supérieure de l'asque peut parfois être déjà coiffée d'une large vacuole (Pl. XXI-A). Çà et là certaines petites vacuoles peuvent contenir un granule réactif (Pl. III-A).

La paroi ascale s'est épaissie; l'endoascus reste peu différencié (Pl. III-C). Le plasmalemme ascal ne présente plus, semble-t-il, de corps paramuraux. A la fin de ce stade l'appareil apical de l'asque est nettement différencié (Pl. XXI-A).

3) Stade tertiaire (Pl. IV, V, VI)

Le stade tertiaire peut être défini par les caractères de la paroi intermédiaire de l'ascospore. Au début du stade tertiaire celle-ci ne montre pas encore de couche finement et régulièrement stratifiée mais, vers la fin du stade tertiaire, on observe une stratification distincte dans une partie de la paroi intermédiaire.

a - Début du stade tertiaire (Pl. IV, V).

On envisagera successivement les modifications de la paroi ascosporale, du sporoplasme et de l'épiplasme; celles de la paroi ascale sont faibles et n'ont pas été étudiées en détail.

α) La paroi ascosporale (Pl. IV; V, A à D).

L'épaisseur de la **périspore** s'accroît de façon très inégale selon l'importance de l'espace épiplasmique disponible autour de l'ascospore et ne peut donc pas être utilisée comme repère chronologique. Alors que la périspore externe, Patag —, reste mince et d'épaisseur uniforme (Pl. V-C), l'épaississement est important au niveau de la périspore moyenne dont la structure se modifie. Des sphérules de petite taille, dépourvues de granules polysaccharidiques (Pl. V-A) mais très réactives à la coloration par l'acétate d'uranyle-citrate de plomb (Pl. V-D) y apparaissent fréquemment. On les qualifiera dans la suite de «**sphérules grises**» (en raison de leur aspect relativement clair après la réaction Patag). Ces sphérules grises peuvent éventuellement être absentes au début du stade tertiaire (Pl. IV-B). Parfois elles existent dès la fin du stade secondaire mais elles sont alors assez rares et de petites dimensions.

Une périspore interne se constitue entre la périspore moyenne et la paroi intermédiaire. Assez mince, d'épaisseur constante, de texture fine et régulière, elle se distingue aisément par son caractère Patag — (Pl. IV-A; V-A) et sa forte réactivité à la réaction à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb (Pl. IV-B; V-B). Elle ne semble pas provenir de la paroi intermédiaire. Il n'a pas été possible de préciser si elle apparaissait entre celle-ci et la périspore moyenne ou si elle se différenciait à partir de la partie basilaire de cette dernière.

Sous la périspore interne la paroi intermédiaire est plus épaisse. Des structures Patag + s'y sont différenciées. On peut maintenant y distinguer trois parties superposées :

I - La **partie externe**, d'épaisseur régulière, sera appelée ici «**couche blanche**». Mince, et Patag —, elle est traversée par de très fins et très nombreux éléments fibrillaires radiaux, régulièrement espacés, à peine réactifs au test Patag. Ces éléments sont constitués par la partie la plus externe des fibrilles observées dans la couche intermédiaire au cours du stade secondaire (Pl. V-A). Une mince lamelle médiane ou «**lamelle noire**» est nettement mise en évidence dans la couche blanche après la réaction Patag en raison de sa forte réactivité mais elle n'apparaît pas après la technique à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb (Pl. V-A, B).

II - La **partie moyenne** de la paroi intermédiaire est la plus développée. Elle sera appelée dans la suite «**couche Castor**» (en liaison avec l'existence d'une «**couche Pollux**» qui sera définie ci-après). D'épaisseur constante elle est Patag — et présente, comme la couche blanche, une striation transversale ténue, Patag +, toujours un peu floue (Pl. IV-A; V-A). Ultérieurement cette striation s'entrecroise avec plusieurs fines strates d'éléments longitudinaux courts et étroits, à peine réactifs au test Patag, et elle prend alors un aspect discrètement quadrillé, plus distinct vers sa base. La technique à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb y révèle la présence d'une bande longitudinale sub-axiale, plus sombre (Pl. V-B).

III - La **partie interne** de la paroi intermédiaire comporte essentiellement la couche Pollux, mince couche sous-jacente à la couche Castor, légèrement plus réactive que celle-ci au test Patag mais d'aspect opaque par la technique à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb. Une très mince bande d'aspect clair après le test Patag mais réactive à la technique à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb sépare les couches Castor et Pollux. Elle n'est distincte que sur les coupes bien orthogonales à la paroi (Pl. V-A, B). Le test Patag révèle une texture très fine dans la couche Pollux, marquée d'une fine striation transversale qui suggère que cette couche s'est établie au niveau de la partie interne des stries radiales observées dans la paroi intermédiaire au stade précédent. La limite interne de la couche Pollux, vers la paroi propre de l'ascospore, apparaît floue après le test Patag.

La **paroi propre** de l'ascospore qui s'est épaissie depuis le stade précédent ne présente pas de modifications structurales importantes (Pl. IV-A, B).

β) Le sporoplasme (Pl. IV-A, B; V-E, F).

Dans le sporoplasme les mitochondries sont abondantes; parfois elles conservent leur aspect du stade précédent mais il arrive que leurs crêtes s'allongent longitudinalement, soient plus nombreuses, plus fines, et se disposent de façon plus régulière, presque parallèlement les unes aux autres. On observe une nette régression du glycogène qui n'est plus représenté que par des granules dispersés. Le reticulum endoplasmique est plutôt moins abondant. Des microvésicules relativement volumineuses, à contenu très transparent aux électrons (Pl. V-E, F) semblent plus nombreuses que précédemment et forment parfois de courtes chaînes. Les vacuoles, assez fréquentes sont toujours petites. Elles résultent encore, semble-t-il, de la résorption de mitochondries. Elles renferment souvent un granule réactif à la technique à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb (Pl. V-G). Le nombre des globules lipidiques s'accroît. Certaines images évoquent leur mode de formation (Pl. V-E). La coloration à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb met en évidence de nombreux ribosomes (Pl. IV-B). Le plasmalemme ascosporal devient plus régulièrement et plus finement onduleux. On remarque l'absence de mitochondries au voisinage même du plasmalemme (Pl. IV-A, B).

γ) L'épiplasme (Pl. IV-A, B; V-G).

Dans l'épiplasme les granules de glycogène sont beaucoup plus abondants qu'au stade précédent et forment des amas denses, assez étendus; sur certaines

images ceux-ci peuvent déjà commencer à entrer en régression. Le glycogène est absent dans une étroite région cytoplasmique contiguë au plasmalemme ascal formant un liséré clair sur les coupes traitées par le test Patag (Pl. V-G). Les mitochondries, petites sont plus nombreuses qu'au stade précédent; elles ont un contenu dense après la réaction à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb et un aspect clair au test Patag; la plupart d'entre elles se trouvent incluses dans les amas de glycogène (Pl. IV-A; V-G); quelques-unes sont au voisinage même de la limitante externe des ascospores. Le reticulum endoplasmique est plus abondant; ses éléments sont généralement épais et très contournés, sauf au voisinage des ascospores où ils sont plus minces; ils sont alors généralement allongés contre la paroi ascosporale (Pl. V-D). Les vacuoles sont assez petites. Les plus internes sont étroitement appliquées contre la limitante externe de l'ascospore. Certaines de ces vacuoles se fusionnent latéralement (Pl. V-C). Le plasmalemme épiplasmique n'est pas modifié.

La paroi ascale s'épaissit mais ne se différencie pas spécialement.

b - Fin du stade tertiaire (Pl. VI).

Les modifications de structure de la **paroi intermédiaire** de l'ascospore sont caractéristiques de la fin du stade tertiaire. La couche Castor est maintenant constituée d'une alternance très régulière de plusieurs strates très minces, alternativement Patag + et Patag – (Pl. VI-E). Cette fine stratification est moins nette vers sa base où les strates Patag –, peut-être plus minces, sont estompées par les strates Patag +, qui sont d'autant plus denses et réactives qu'elles sont proches de la base de la couche Castor. L'action de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb donne une sorte d'image en négatif de la couche Castor car les strates Patag – sont alors réactives alors que les strates Patag + ne le sont pas (Pl. VI-D).

Après le test Patag la couche blanche qui surplombe la couche Castor reste ceinturée par la lamelle noire. Celle-ci semble devenue un peu plus réactive quoiqu'elle puisse apparaître artificiellement épaissie sur les coupes qui ne sont pas rigoureusement orthogonales à la paroi (Pl. VI-B).

La couche Pollux, sous la couche Castor, est très sombre après la réaction à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb (Pl. VI-D); elle est devenue un peu plus réactive au test Patag après lequel sa limite inférieure reste assez imprécise. Une mince couche Patag –, signalée précédemment, la sépare encore de la couche Castor.

Dans la **périspore**, sous la limitante externe de l'ascospore, la mince périspore externe, à peine réactive au test Patag est toujours distincte. Dans la périspore moyenne la taille et le nombre des sphérules grises sont très variables. Celles-ci sont parfois abondantes et assez grosses dans certaines parties d'une ascospore mais sont très discrètes ailleurs (Pl. VI-A).

Une couche d'épaisseur régulière ou «**couche support**» s'individualise à la base de la périspore interne par sa réactivité très légèrement plus forte au test Patag (Pl. VI-E). C'est à son niveau qu'apparaîtra ultérieurement la pigmentation.

A ce stade la **paroi propre** de la spore, dont la structure est inchangée, présente son épaisseur maximale.

Dans le **sporoplasme** les mitochondries sont plus nombreuses. Elles ont d'ordinaire davantage de crêtes; celles-ci sont fines, plus ou moins longitudinales et disposées parallèlement (Pl. VI-C). Le glycogène est absent, ou peu s'en faut. Le reticulum endoplasmique reste rare mais les microvésicules deviennent plus nombreuses; leur association avec certains éléments réticulaires rappelle parfois des figures frustes d'appareil de Golgi (Pl. VI-C). Les globules lipidiques, un peu plus nombreux ne sont jamais abondants. On observe encore de petites vacuoles de régression et des ribosomes. Dans le noyau sporal, dont la paroi est nettement fenêtrée, des plages de chromatine peuvent être observées.

Le plasmalemme sporal présente parfois de nombreuses sinuosités très étroites, assez profondes, et sensiblement de même taille, formant de petites saillies régulières dans le sporoplasme. L'aspect très particulier qu'il présente alors sur les coupes sera qualifié ici d'aspect «**en chevrons**» (Pl. VI-B).

Dans l'**épiplasme** la quantité de glycogène commence à régresser. Des mitochondries et des éléments réticulaires sont toujours présents. Les vacuoles sont nombreuses, encore petites; la limitante externe de l'ascospore fait souvent saillie vers l'extérieur entre les vacuoles épiplasmiques les plus internes appliquées contre les ascospores, comme si chacune de ces vacuoles exerçait une pression physique contre l'ascospore. La fusion latérale de vacuoles autour des ascospores n'est guère plus avancée qu'au début du stade tertiaire.

On ne note pas de modification sensible au niveau du plasmalemme et de la paroi de l'asque.

4) Stade de maturation (Pl. VII à XI).

Par commodité on considèrera que la pigmentation marque le début de la maturation et on distinguera trois temps dans la maturation : le début de maturation, le cours de maturation, la maturation avancée.

a - Début de maturation (Pl. VII).

La pigmentation s'établit brutalement. L'étude de nombreuses ascospores ne nous a pas permis de trouver des stades de transition entre des stades tertiaires terminaux, sans trace de pigmentation, et des stades où la couche de pigmentation est déjà importante.

La pigmentation s'établit au niveau de la couche support de la périspore interne qui devient la «**couche de pigmentation**» (Pl. VII-A, B). Sa matrice, transparente aux électrons après le test Patag, et non structurée, reste analogue à ce qu'elle était au stade précédent. Elle est envahie de «**granules**» grossièrement subsphériques, de taille relativement importante (0,05µm), faiblement réactifs au test Patag. Ces granules peuvent rester séparés ou être fusionnés en petites masses laissant entre elles quelques interstices Patag –, de formes et de dimensions variées. De très petits «**grains**» (0,005µm), très fortement Patag +, sont irrégulièrement répartis dans toute la couche de pigmentation.

On les rencontre essentiellement dans les granules précédents, ou à leur contact, mais on peut en observer aussi à l'extérieur de ces granules. L'ensemble des granules et des grains rend la couche de pigmentation très fortement opaque aux électrons après le test Patag.

Après la technique à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb on observe dans la matrice claire de très nombreux granules sombres, de moins de 0,1μm de diamètre, à contenu dense et hétérogène d'analyse difficile. Ces granules sont probablement les mêmes que ceux que révèle le test Patag.

L'opacité aux électrons est renforcée dans certaines zones de la couche de pigmentation où les granules denses, localement plus abondants, sont associés avec plus de cohésion. Ces zones ne sont pas disposées de façon absolument quelconque; elles dessinent un aspect en «**flammes**», orientées plus ou moins obliquement par rapport à la surface de la spore, et semblent témoigner de l'existence de dispositions hélicoïdales dans la paroi ascosporale.

La partie externe de la couche de pigmentation est, elle aussi, plus opaque aux électrons. Elle présente l'aspect d'une «**croûte**», plus ou moins craquelée çà et là, dont la surface externe forme des sortes de bombements surbaissés, de taille et de forme irrégulières. Cette croûte est séparée du reste de la couche de pigmentation par une mince zone de matrice, Patag –, plus ou moins discontinue et d'épaisseur irrégulière, dépourvue des granules et des grains de pigmentation.

La partie supérieure de la croûte de la couche de pigmentation est séparée de la périspore interne qui la surplombe par une mince «**frange**», Patag –, non structurée, dans laquelle on peut observer cependant, çà et là, quelques amas assez dispersés de granules faiblement Patag +. Ces granules sont du même type que ceux de la couche de pigmentation mais leur dimension est plus réduite. Ils renferment, eux aussi, quelques grains très fins, fortement Patag + (Pl. VII-B). La croûte de la couche de pigmentation et la couche claire sous-jacente sont également distinctes après la technique à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb (Pl. XI-D).

Au-dessus de la frange qui surplombe la croûte de la couche de pigmentation, la périspore interne est à peine réactive aussi bien au test Patag (Pl. VII-A, B) qu'à la technique à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb (Pl. XI-B, D). De texture fine et homogène, analogue à celle qu'elle avait précédemment, elle ne renferme aucun granule ou grain Patag + (Pl. VII-B). Elle est séparée de la périspore moyenne sous-jacente par une mince couche, ou «**couche de transition**», dont la matrice non structurée, est très claire soit après le test Patag (Pl. VII-B) soit après la réaction à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb (Pl. XI-B, C, D). Cette matrice contient des granules plus ou moins subsphériques, assez faiblement Patag +, analogues à ceux de la couche de pigmentation mais de taille plus faible et de forme plus irrégulière; ces granules renferment eux aussi des grains très fins, Patag +, moins réactifs que ceux des grains de la couche de pigmentation (Pl. VII-B). Après la technique à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb on observe aussi des granules dans la couche de transition; ils sont plus petits et moins réactifs que ceux de la couche de pigmentation, de minces

prolongements s'en échappent et leur contour est assez diffus (Pl. XI-D).

La **périspore moyenne**, à l'extérieur de la périspore interne, renferme, comme avant la pigmentation, de nombreux grains fins, Patag +, répartis de façon assez régulière. Ils sont souvent disposés autour de très petites masses, plus faiblement réactives au test Patag, dont la section est plus ou moins elliptique. Ces petites masses, d'aspect homogène, sont dépourvues de fins grains Patag + (Pl. VII-B).

Dans certaines «**aires**» subglobuleuses ou ovales, de dimensions variées et d'aspect très clair (Pl. VII-A), la matrice de la périspore interne contient des granules d'aspect et de taille analogues à ceux de la couche de transition. Ils renferment eux-aussi de fins grains Patag +. Il semble que ces aires, plus ou moins subglobuleuses, soient différentes des sphérules grises décrites dans la périspore moyenne au cours du stade tertiaire. Toutefois la disparition effective de ces dernières, avant la pigmentation, n'a pu être constatée et reste à confirmer. Les aires claires subglobuleuses de la périspore moyenne semblent être des régions où s'ébauche localement un processus de pigmentation dont le terme reste moins avancé que dans la couche support.

La **périspore externe** s'amincit; elle conserve son aspect clair après le test Patag. La **limitante externe** de l'ascospore, Patag +, reste bien individualisée (Pl. VII-A).

Sous la couche de pigmentation, la **couche blanche** (partie supérieure de la paroi intermédiaire de l'ascospore) reste Patag –. Elle est d'autant plus distincte qu'elle fait maintenant contraste avec la couche de pigmentation et que la réactivité de sa striation transversale sinueuse, formée de fins granules alignés, s'est renforcée (Pl. VII-B). Cette striation se prolonge de façon irrégulière et discrète dans la partie inférieure de la couche de pigmentation qui la surplombe; la surface de base de celle-ci est donc assez imprécise et irrégulière. La lamelle noire médiane de la couche blanche, qui était très réactive au test Patag, a maintenant complètement disparu. Elle s'est probablement effacée sur place, mais on pourrait envisager qu'elle se soit intégrée à la couche de pigmentation ou à la couche Castor sous-jacente.

La **couche Castor** s'est modifiée; elle est devenue plus dense et plus réactive (Pl. VII-A, B; XI-A, D); sa fine stratification longitudinale est masquée par de nombreux granules très fins, Patag +. Ces granules sont apparemment analogues à ceux qui ont été mentionnés ci-dessus dans la couche de pigmentation. La fine couche, d'aspect clair après le test Patag, qui sépare la couche Castor de la couche Pollux paraît plus nette par contraste avec la réactivité de la couche Castor (Pl. VII-A, B). La réactivité de la **couche Pollux** s'atténue; les limites de celle-ci, surtout celles de la base, deviennent imprécises (Pl. VII-A, B; Pl. XI-A, D).

Certaines caractéristiques de la **paroi propre** de la spore ont dû se modifier car les coupes sont fréquemment déchirées à son niveau. Pourtant son aspect est inchangé. Parfois, cependant, on y observe une fine pulvérulence de granules Patag + (Pl. VII-B). Parfois sa partie basilaire est un peu plus réactive au test de Thiéry.

Bien qu'il apparaisse très brusquement le processus de pigmentation est relativement complexe puisque, dans la couche support, il met en œuvre à la fois des granules assez gros et des grains plus fins et que la périspore et la paroi intermédiaire en sont affectées. Le produit final reste cependant localisé à une couche précise, la couche support, apparemment préformée.

Au niveau du **sporoplasme** les études cytologiques sont assez délicates car on sait que chez les spores mûres il se sépare du reste de la coupe, se replie ou s'arrache. On peut cependant constater que les mitochondries, encore plus abondantes, ont toujours de nombreuses crêtes longitudinales fines et subparallèles (Pl. VIII-D). Vers la périphérie du sporoplasme le reticulum endoplasmique, moins abondant se dispose parallèlement au plasmalemme sporal. Des microvésicules et des globules lipidiques sont encore présents. Le glycogène est très rare. Le plus souvent le plasmalemme sporal présente l'aspect en chevrons décrit précédemment; mais il arrive qu'il ait encore un aspect sinueux (Pl. VIII-D). A la périphérie du sporoplasme les organites sont plus rares.

Dans l'**épiplasme** les îlots de glycogène sont en nette régression; leurs granules constitutifs sont maintenant plus ou moins dispersés dans des structures de type vacuolaire (Pl. VII-A). Les mitochondries restent bien individualisées. Le reticulum endoplasmique est assez abondant. Les vacuoles périsporiques augmentent un peu de taille; elles continuent à se fusionner latéralement, de façon progressive (Pl. VII-A). Les sections du plasmalemme ascal sont plus irrégulières; la surface de l'asque devient un peu onduleuse.

b - Cours de maturation (Pl. VIII).

Après l'établissement de la pigmentation la maturation de l'ascospore s'accélère et des modifications ultrastructurales notables apparaissent.

Le changement d'aspect du **sporoplasme** est particulièrement manifeste avec le test Patag. Les mitochondries devenues très nombreuses et presque contiguës ne montrent plus de crêtes; dans les coupes elles apparaissent comme des sections elliptiques, Patag –, limitées par des granules Patag + dont l'aspect est un peu différent des grains de glycogène (Pl. VIII-A). Simultanément le reticulum endoplasmique s'est effacé et les globules lipidiques perdent en partie leur réactivité. De plus l'ensemble du sporoplasme semble lâchement poudré de très fins granules, plus petits et moins nettement Patag + que ceux qui entourent les mitochondries; ces granules possèdent une auréole claire et ressemblent en cela à de minuscules globules lipidiques (Pl. VIII-C).

Au niveau de la paroi ascosporale les modifications sont moindres. La paroi propre paraît inchangée. Dans la paroi intermédiaire c'est la **couche Castor** qui est la plus affectée. Après la réaction Patag la stratification n'y est plus apparente; elle est masquée, ou effacée, par le développement de très nombreux granules polysaccharidiques qui lui donnent un aspect beaucoup plus dense (Pl. VIII-B). La **couche Pollux** est devenue moins réactive au test Patag. La couche blanche reste dépourvue de lamelle noire.

Dans la **couche de pigmentation** les granules fondamentaux, faiblement

Patag +, toujours accompagnés de fins grains polysaccharidiques, sont nettement plus coalescents qu'au stade précédent et l'aspect en flammes est plus clairement marqué (Pl. VIII-B). La croûte de la partie supérieure de la couche de pigmentation est mieux individualisée ainsi que la couche blanche irrégulière qui lui est sous-jacente (Pl. VIII-B).

La **périspore moyenne** perd un peu de sa réactivité et sa texture devient un peu plus lâche (Pl. VIII-A, B). Les zones subglobuleuses qui y ont été mentionnées au stade précédent y sont devenues, elles aussi, moins réactives (Pl. VIII-A).

La **périspore interne** n'est plus toujours visible sur toute la surface de l'ascospore. A certains endroits la couche de pigmentation vient donc au contact direct de la couche de transition qui renferme encore de nombreux granules (Pl. VIII-B).

La **périspore externe** cesse pratiquement d'être distincte (Pl. VIII-A).

L'aspect de l'**épiplasme** est généralement peu différent de celui qu'il présentait précédemment. Le glycogène est moins abondant. Il n'est pas rare que le long des ascospores les vacuoles périsporiques restent çà et là, peu développées (Pl. VIII-A).

c - Fin de maturation (Pl. IX - X - XI).

Quand la maturation de l'ascospore est très avancée l'aspect du sporoplasme ainsi que celui de la périspore et de l'épiplasme deviennent caractéristiques.

Dans le **sporoplasme** les mitochondries sont toujours très nombreuses; leur paroi et leurs structures internes restent indistinctes au test Patag. Elles limitent un réseau de granules nettement Patag +, relativement lâche, tandis que leurs sections paraissent toujours poudrées de très nombreux grains très fins (Pl. X-B, C). Au milieu des mitochondries les globules lipidiques sont devenus très abondants : certains sont peu réactifs au test de Thiéry et leur partie centrale, plus pâle est très homogène; d'autres beaucoup plus nettement réactifs renferment des grains fortement Patag +. Ceci incline à penser qu'une synthèse de nouveaux globules lipidiques accompagne la maturation; les globules les plus clairs seraient alors les plus anciens. L'aspect en chevrons du **plasmalemme sporal** apparaît d'autant mieux que la partie périphérique du sporoplasme est dépourvue de mitochondries et de lipides. Tout à la fin de la maturation la partie centrale du sporoplasme est occupée par un amas dense de granules Patag + en continuité avec le réseau qui entoure les mitochondries. Le sporoplasme présente alors une zonation concentrique tout à fait remarquable. Un large amas de granules, central, est entouré d'une couche médiane épaisse contenant des mitochondries et des globules lipidiques; celle-ci est elle-même circonscrite par une région périphérique sans organites bordée par le plasmalemme en chevrons (Pl. X-B, C).

La structure de la paroi propre de l'ascospore reste inchangée. Dans la paroi intermédiaire la **couche Pollux** perd de son individualité et, après le test Patag, elle n'apparaît plus que sous la forme d'une mince frange assez claire. Celle-ci

souligne la **couche Castor** qui est encore plus dense. La **couche de pigmentation** devient, elle aussi, très opaque aux électrons; les granules qui la composent, maintenant coalescents, sont indistincts et l'aspect en flammes est particulièrement net (Pl. IX-C). Une couche unique Patag – sépare désormais la couche de pigmentation de la périspore moyenne; il est probable que la périspore interne se réduit à des zones lenticulaires plaquées sur la couche de pigmentation; puis les granules de la couche de transition s'effacent peu à peu. Alors

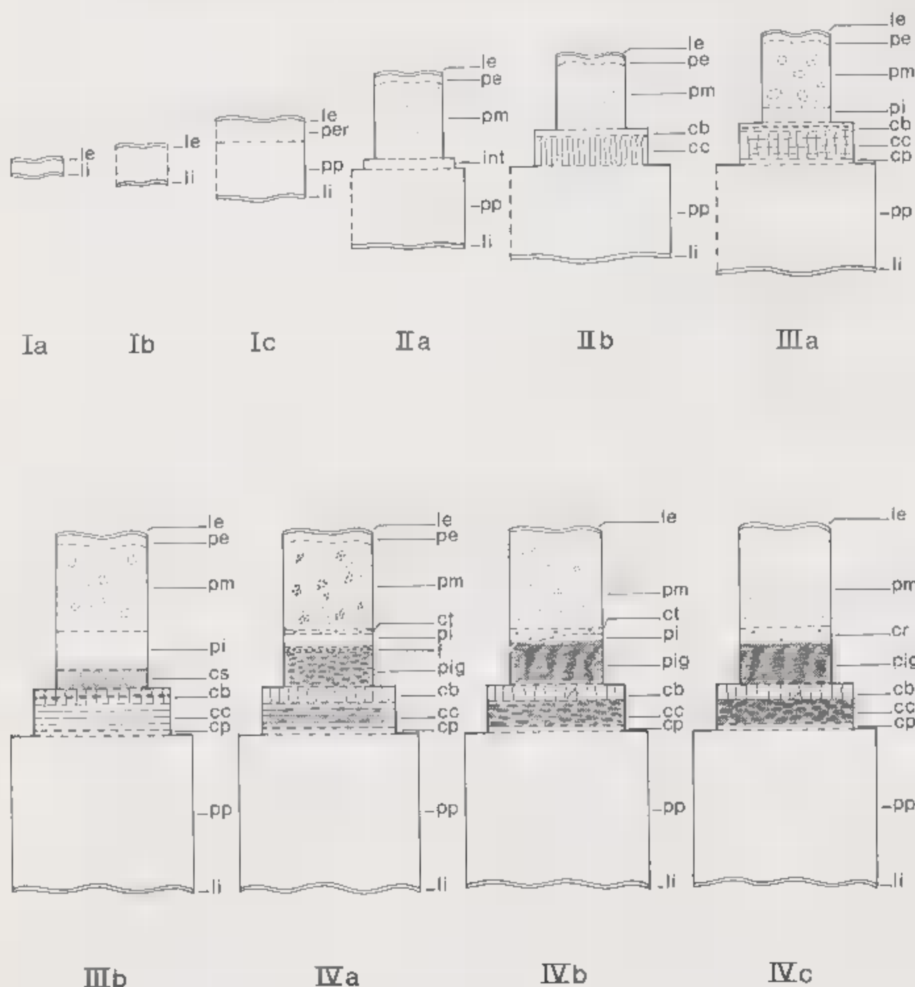


Fig. 2. – Schéma récapitulatif du développement de la paroi des ascospores de la lignée sauvage de l'*Ascobolus immersus*. I, Stades primaires; II, Stades secondaires; III, Stades tertiaires; IV, Stades de maturation. (Pour les légendes se reporter à la légende générale des planches, p. 333).

cette couche et les restes de la périspore interne se fondent en une couche unique, claire, où l'on observe parfois quelques granules (Pl. IX-C).

Tandis que progresse la maturation, la **périspore** présente une texture de plus en plus lâche. Après le test Patag on y observe quelques globules subsphériques d'aspect assez proche de celui de globules lipidiques (Pl. X-A). Mais au contraire de ces derniers ces globules subsphériques sont réactifs à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb (Pl. XI-A, E). Ils correspondent probablement aux aires claires subglobuleuses de la périspore interne signalées en début de maturation; celles-ci se sont modifiées par l'effacement progressif des granules Patag + qu'elles contenaient et par la densification de leur partie centrale. Dans la périspore des ascospores très âgées le test Patag révèle des précipités irréguliers, très denses, de tailles et de formes très diverses. Leur nature et leur origine n'ont pu être précisées. La limitante externe de l'ascospore reste toujours très nette (Pl. X-A).

L'**épiplasme** persiste très longtemps sous la paroi ascale. Le glycogène y reste abondant. Jusqu'à des stades avancés on y rencontre de petites mitochondries parfois entourées de granules de glycogène (Pl. IX-B). L'épiplasme se réduit ensuite à une mince frange appliquée contre la paroi ascale. Puis des figures myéliniques s'établissent sur son emplacement (Pl. IX-D). Dans le complexe vacuolaire qui sépare l'épiplasme des ascospores on observe alors fréquemment diverses concrétions et précipités irréguliers, fortement Patag +, rappelant l'aspect de ceux que l'on rencontre dans la périspore moyenne (Pl. IX-D).

Les Fig. 2 et 3 résument les principales caractéristiques du développement des éléments constitutifs des ascospores de la lignée sauvage.

B. - LE DÉVELOPPEMENT DES ASCOSPORES CHEZ LE MUTANT CEINTURÉ

1) Stades précédant la pigmentation (Pl. XII, XIII).

Le schéma d'ensemble du développement des ascospores de type ceinturé est analogue à celui des ascospores de la souche sauvage. Les différences cytologiques sont minimes; la plupart, plus ou moins fluctuantes, ne sont généralement pas significatives. On observe cependant que les globules lipidiques du **sporoplasme** de la très jeune spore sont d'une façon générale, moins rares que chez la souche sauvage (Pl. XII-B). De plus leur structure est légèrement différente, au moins au stade tertiaire. Les fins granules opaques aux électrons qu'y révèle le test Patag y sont en effet plus grossiers que ceux du type sauvage. Ils sont aussi souvent plus abondants vers la périphérie des globules lipidiques et donnent à ceux-ci un aspect hérissé, en «**oursin**» (Pl. XIII-D). On rencontre aussi d'autres globules lipidiques moins réactifs, à centre clair, qui sont sans doute plus âgés (Pl. XIII-D). Dans l'**épiplasme** du mutant ceinturé les vacuoles qui entourent les jeunes ascospores sont plus isodiamétriques que celles de la lignée sauvage qui, on l'a vu, restent longtemps minces et allongées contre la paroi sporale. En outre les vacuoles du mutant ceinturé peuvent contenir assez fréquemment

plusieurs petits granules de précipité appliqués contre le tonoplaste (Pl. XII-C, G).

Enfin chez le mutant ceinturé la maturation du sporoplasme paraît un peu accélérée relativement à la lignée sauvage. En particulier la structure en chevrons du plasmalemme ascosporal semble s'établir plus précocement (Pl. XIII-D).

2) Pigmentation des ascospores du mutant ceinturé (Pl. XIV, XV, XVI).

On sait que chez le mutant ceinturé les ascospores ont une pigmentation qui, dans l'ensemble, est un peu plus faible que celle de la souche sauvage mais qui est renforcée au niveau de la région équatoriale de la spore où elle forme une sorte de ceinture plus sombre.

En microscopie électronique à transmission, aussi bien après le test Patag qu'après la technique à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb, on constate que la jeune couche de pigmentation paraît subdivisée en trois sous-couches au niveau de la région équatoriale de la spore (Pl. XIV-A, B). La sous-couche basilaire, épaisse, est très opaque; la fine sous-couche submédiane a une apparence claire; la mince sous-couche tectale est formée d'une strate unique plus ou moins discontinue formée de gros granules à contour flou, opaques aux électrons, qui peuvent être contigus par leurs faces latérales. La **sous-couche basilaire** est revêtue d'une croûte, plus dense, relativement mince, analogue à celle qui recouvre la couche de pigmentation en dehors de la ceinture équatoriale de la spore. Cette sous-couche correspond donc, à elle seule, à la couche de pigmentation. Celle-ci est donc amincie au niveau de la ceinture et la sous-couche tectale est une formation pigmentaire surnuméraire propre au mutant ceinturé.

La couche de pigmentation du mutant ceinturé a une texture un peu différente de celle de la lignée sauvage (Pl. XIV-D). Elle n'est formée que de petits grains (0,01 μm environ), Patag +, qui diffèrent de ceux de la lignée sauvage. Ils sont un peu plus gros, ne sont pas sphériques mais présentent un contour assez irrégulier; ils ne sont pas contenus dans des granules. Ces grains se fusionnent, çà et là, sans cependant perdre tout à fait leur autonomie. Ils constituent ainsi des amas plus denses qui dessinent des flammes analogues à celles qui ont été décrites chez la lignée sauvage. Ils forment aussi, par association latérale, la croûte superficielle de la couche de pigmentation. Les granules de la **sous-couche tectale** sont formés uniquement de grains contigus, associés, çà et là, en petits amas plus denses qui forment une sorte d'ossature à ces granules.

Contrairement à ce qui a été observé chez la lignée sauvage la couche de pigmentation vient directement au contact de la périspore moyenne sans que persiste la périspore interne. La couche de pigmentation paraît donc ici s'étendre rapidement à l'ensemble de la périspore interne. La **sous-couche submédiane** de la couche de pigmentation a un aspect plus dense que la périspore moyenne dont la texture en fin réseau est assez lâche.

Pendant la pigmentation on observe également la présence de nombreux éléments globuleux fortement Patag + dans toute la périspore moyenne des

ascospores du mutant ceinturé. Ces éléments sont formés de nombreux grains dont l'aspect est identique aux grains de la sous-couche tectale de la ceinture (Pl. XIV-D). Ils diffèrent des globules subsphériques observés à ce stade dans la périspore moyenne des ascospores de type sauvage qui ont une réactivité beaucoup plus faible; leur structure est aussi un peu différente puisqu'ils se composent de quelques granules contenant des grains Patag +.

Il est remarquable que chez le mutant ceinturé, comme chez la lignée sauvage, la lamelle noire de la couche claire de la paroi intermédiaire disparaisse au début de la pigmentation (Pl. XIV-B, D).

3) Maturation des ascospores chez le mutant ceinturé

a - Modification de la ceinture (Pl. XV).

Au cours de la maturation de l'ascospore les granules de la sous-couche tectale de la ceinture pigmentée se fusionnent latéralement. Un revêtement continu, très dense mais relativement mince, se constitue ainsi à l'extérieur de la sous-couche submédiane claire qui s'épaissit notablement. La sous-couche basilaire ne s'accroît pas mais sa texture devient plus dense (Pl. XV-A, B). Ultérieurement l'épaisseur de la sous-couche tectale devient irrégulière. Des granules petits et nombreux [redacted] forment dans la partie claire, submédiane de la ceinture (Pl. XV-C). A maturité, ces granules sont plus volumineux, d'aspect irrégulier et sont plus rares (Pl. XV-D). La texture de la matrice qui les renferme devient très fine.

b - Modification des autres éléments structuraux de la spore [redacted] cours de la maturation (Pl. XVI).

Dans leur ensemble les modifications ultrastructurales des ascospores du mutant ceinturé sont analogues à celle de la lignée sauvage.

Dans le **sporoplasme**, on note les mêmes phénomènes de perte de réactivité des mitochondries au test Patag (Pl. XVI-C, D, E). On observe aussi l'augmentation du nombre des globules lipidiques et leur répartition en deux types distincts, les uns peu réactifs au test Patag et à centre clair, les autres réactifs et contenant des granules plus gros que chez la lignée sauvage avec parfois aussi un aspect en oursin (Pl. XVI-E). Un réseau de granules denses et réactifs se constitue, ici aussi, autour des mitochondries. Des granules dispersés forment un voile de fond sur l'ensemble du sporoplasme. Le plasmalemme ascosporal est typiquement en chevrons. Enfin, une zonation concentrique des constituants du sporoplasme s'établit à maturité : une bordure externe dépourvue d'organites et de granules recouvre une couche à mitochondries et globules lipidiques, qui entoure une région plus interne formée de granules réactifs. Cette zonation paraît cependant s'établir plus précocement que chez la souche sauvage. Avec la maturation, la texture de la périspore devient, ici aussi, de plus en plus lâche.

Dans l'**épiplasme** la régression des amas de glycogène se fait comme chez la lignée sauvage. Il est remarquable qu'à un stade assez avancé de maturation la frange d'épiplasme qui persiste contre la paroi ascale (avec encore des grains de glycogène et des mitochondries) forme souvent des hernies saillantes dans

la grande vacuole périsporique de la maturité (Pl. XVI-B). Ces hernies assez larges, subglobuleuses, paraissent pouvoir se séparer de l'épiplasme. Sans être absolument absentes chez la lignée sauvage, elles y sont exceptionnelles.

On peut noter enfin, accessoirement, que la surface de l'asque mûr est également moins irrégulièrement onduleuse chez le mutant ceinturé que chez la lignée sauvage (Pl. XVI-B; IX-A).

C. - LE DÉVELOPPEMENT DES ASCOSPORES CHEZ LE MUTANT ALBINOS

Pigmentation mise à part, le développement général des ascospores du mutant albinos est analogue dans ses grandes lignes à celui des ascospores de la lignée sauvage et du mutant ceinturé.

Chez le mutant albinos il est difficile de définir les critères de début de maturation de l'ascospore car on ne peut se référer qu'aux caractères non pigmentaires de la lignée sauvage et du mutant ceinturé. Or on a vu que les modifications ultrastructurales des ascospores et de l'asque contemporaines de la pigmentation, sont peu nombreuses, peu caractéristiques et que leur synchronisme avec la pigmentation n'est pas absolu. Le début de maturation du mutant albinos peut cependant être caractérisé avec une précision satisfaisante par la présence simultanée d'une couche support dans la périspore interne, d'une stratification de la couche Castor et d'un ou plusieurs des caractères suivants : sporoplasme avec mitochondries à fines crêtes longitudinales et couche périphérique sans organites, plasmalemme ascosporal en chevrons, glycogène de l'épiplasme pratiquement au maximum de son abondance.

1) Stades précédant la maturation des ascospores chez le mutant albinos (Pl. XVII, XVIII).

Au cours de ces stades les grandes analogies entre le mutant albinos et les lignées pigmentées sont attestées par les Pl. XVII et XVIII comparativement aux Pl. I à VI et XII-XIII. Sans reprendre en détail ces analogies on notera en particulier que chez le mutant albinos la paroi intermédiaire se subdivise également en une couche blanche (pourvue d'une lamelle noire médiane)(Pl. XVIII-A, B, C), une couche Castor (avec le même type de différenciation) et une couche Pollux (Pl. XVII-B, C, D; XVIII-A, B, C). La périspore est également subdivisée en trois couches. Les sphérules grises sont fréquentes dans la périspore moyenne (Pl XVIII-C). Au stade tertiaire les mitochondries ont également de nombreuses crêtes fines subparallèles (Pl.XVIII-E).

Quelques différences cytologiques existent cependant à ces stades entre les ascospores albinos et les ascospores pigmentées. Une première différence porte sur les vacuoles épiplasmiques qui entourent les jeunes ascospores. Chez le mutant albinos, ces jeunes vacuoles restent généralement assez étroites et plus hautes que larges (Pl. XVII-A), alors qu'elles sont plutôt subsphériques

chez le mutant ceinturé et plus larges que hautes chez la lignée sauvage. De plus chez l'albinos ces vacuoles ne confluent pas toujours par la totalité de leurs faces latérales mais seulement par leur partie distale par rapport à l'ascospore. De ce fait, en début de maturation celle-ci présente une surface hérissée (Pl. XVIII-A; XIX-C). De plus les jeunes vacuoles épiplasmiques périsporiques du mutant albinos renferment un ou même plusieurs précipités subsphériques, relativement volumineux, opaques aux électrons (Pl. XVIII-A). Des précipités d'un type analogue peuvent se rencontrer éventuellement chez le mutant ceinturé (Pl. XII-G) et plus rarement chez la lignée sauvage (Pl. III-A; IV-A) mais ils sont toujours de taille plus réduite et leur présence est plus aléatoire. Après fusion des vacuoles épiplasmiques périsporiques en une vacuole unique ces précipités adhèrent à la surface externe de la spore albinos sous forme de gros granules spécialement réactifs après le test à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb (Pl. XIX-A).

Une seconde différence entre les ascospores albinos et pigmentées se manifeste au niveau des lipides du sporoplasme. Au stade primaire ceux-ci apparaissent un peu plus précocement chez le mutant albinos que chez la lignée ceinturée, qui est elle-même un peu plus précoce à cet égard que la lignée sauvage (Pl. XVII-A; XII-B, C; II-C). Aux stades secondaire et tertiaire du développement le mutant albinos est un peu plus riche en globules lipidiques que le mutant ceinturé et, a fortiori, la lignée sauvage. Ces globules lipidiques, dont la partie centrale est dense, diffèrent de ceux des ascospores pigmentées qui sont un peu moins sombres au centre (Pl. XVII-B; XII-B; III-D).

2) Maturation du mutant albinos (Pl. XIX, XX).

Au cours de leur maturation les ascospores du mutant albinos présentent un certain nombre de particularités. Tout d'abord en ce qui concerne la **paroi intermédiaire**, on constate que la lamelle noire de la couche blanche persiste en cours de maturation (Pl. XIX-A; XX-C, F) alors qu'elle s'efface dès la pigmentation chez les ascospores pigmentées. On observe également que la couche Castor de la paroi intermédiaire conserve plus longtemps son aspect finement stratifié (Pl. XX-C, D); cette couche ne devient dense qu'en fin de maturation (Pl. XX-F) et cette densité est plus faible que chez les lignées pigmentées.

Au niveau de la **périspore** interne, la couche support, qui s'est développée en début de maturation (Pl. XIX-A, B), ne se pigmente pas puis cesse bientôt d'être distincte de la périspore interne (Pl. XX-C, F). Cette dernière conserve son individualité et, en fin de maturation, reste beaucoup plus dense que la périspore moyenne (Pl. XX-C).

Chez les ascospores du mutant albinos, comme chez les ascospores pigmentées, la périspore moyenne contient des granules Patag + (Pl. XIX-A, D). Mais chez le mutant albinos ces granules sont plus petits que ceux qui ont été rencontrés chez les lignées pigmentées. Ils diffèrent aussi de ces derniers par leur structure. Les grains qu'ils contiennent sont minuscules (0,005μm) et ne diffèrent guère par leur taille et leur réactivité des grains qui forment la trame de la

périspore moyenne. Si les granules qui les renferment sont Patag +, c'est essentiellement en raison de la réactivité de leur trame et non par la présence de ces grains. Après la technique à l'acétate d'uranyle - citrate de plomb, ces granules apparaissent plus sombres que le fond de la périspore moyenne mais leur infrastructure n'est pas très différente de cette dernière.

Chez le mutant albinos les globules lipidiques du sporoplasme mûr sont de deux types comme ceux des ascospores pigmentées mais leur aspect est différent. Le premier type de globules, plus réactif au test Patag, renferme de fines granulations transparentes aux électrons; celles-ci confèrent à ces globules un aspect «**en passoire**» (Pl. XX-B, E) qu'on n'observe pas chez les ascospores pigmentées (Pl. X-B, C; XIII-D). L'autre type de globules ■ sa partie centrale plus dense que celle des globules lipidiques de la lignée sauvage et du mutant ceinturé (Pl. XX-A, B, E; X-C; XIII-D). De plus ces globules lipidiques du sporoplasme ne sont pas disposés de façon aléatoire comme chez les ascospores pigmentées; ils sont plus ou moins rassemblés en petits amas irréguliers, sans être cependant contigus.

On peut remarquer enfin que chez le mutant albinos la paroi de l'asque mûr ne paraît pas onduleuse à maturité, au contraire de ce qu'on observe chez ces lignées pigmentées.

III. — DISCUSSION

Des études ultrastructurales comparatives de spores d'une lignée sauvage et d'un mutant albinos n'ont concerné jusqu'à présent que des champignons imparfaits. Chez l'*Helminthosporium oryzae* (MASAGO, 1961) et chez l'*Alternaria brassicicola* (CAMPBELL et al., 1968; CAMPBELL, 1970) les différences constatées résultent seulement de l'absence de pigment (mélanines). Chez l'*Aspergillus nidulans* (BULL et FAULKNER, 1965; BULL, 1970) la paroi du mutant albinos est plus riche en glucides et en résidus d'acides uroniques. Chez le *Dreschlera sorokiniana* (AL RIKABI, 1976; OLAH et al., 1977; AL RIKABI et BONALY, 1977; AL RIKABI et al., 1979) il n'a pas été constaté de modifications structurales de la paroi; celle-ci présente cependant une réaction plus forte au test Patag; elle est donc plus riche en polysaccharides (en particulier en hexoses); mais le xylose (pentose) fait défaut et un déficit en galactose et mannose est observé. La sensibilité de la paroi aux agents chimiques et enzymatiques est modifiée.

En ce qui regarde les ascospores, l'intérêt de la comparaison d'une lignée sauvage et d'un mutant albinos a été évoqué seulement par HACKETT et CHEN (1976) à propos de *Sordaria brevicollis*. Une étude ultrastructurale comparée d'une souche sauvage et de mutants vient d'être faite par ZICKLER et SIMONET (1980) sur le *Podospora anserina* mais porte sur un mutant à sporulation déficiente.

Pour ce qui est des trois lignées de l'*Ascobolus immersus* étudiées ici, on

discutera d'abord des caractères ultrastructuraux qui leur sont communs puis de ceux qui les différencient.

A. - ÉLÉMENTS DU DÉVELOPPEMENT COMMUNS AUX TROIS LIGNÉES (Fig. 3)

Le développement des trois lignées étudiées ici se déroule selon un même schéma d'ensemble. Quelques-unes des caractéristiques ultrastructurales communes sont commentées ici.

1) Stades antérieurs à la maturation.

a - Sporoplasme.

D'importantes modifications de structure des **mitochondries** ont été observées au début du développement des ascospores. Au cours des stades primaire et secondaire les mitochondries, relativement peu nombreuses, n'ont que quelques crêtes épaisses et irrégulières, de disposition aléatoire. Au stade tertiaire le nombre des mitochondries s'accroît; les crêtes mitochondriales deviennent plus nombreuses, ont une texture plus fine, et se disposent longitudinalement. Ces faits, à notre connaissance, n'ont pas encore été signalé chez des Discomycètes.

Le **glycogène** n'est jamais abondant dans le sporoplasme avant la maturation; son développement maximal se produit au stade secondaire; ensuite il s'efface.

Les **vacuoles** sont presque totalement absentes; les très petites vacuoles observées dans les stades précédant la maturation paraissent résulter de l'autophagie de mitochondries.

Les **globules lipidiques**, de taille analogue chez les trois souches, sont rares au début; leur nombre commence à s'accroître peu avant la maturation.

b - Paroi ascosporale.

Elle peut être subdivisée en trois parties : paroi propre, paroi intermédiaire et périspore.

La paroi propre, épaisse, non réactive aux techniques utilisées, s'accroît en épaisseur mais son aspect ne varie guère au cours du développement.

La paroi intermédiaire a une structure complexe. Elle comporte en particulier une couche blanche avec lamelle noire médiane, une couche Castor, dont la striation transversale fait place à une stratification longitudinale finalement empâtée de granules, et une couche Pollux, sous-jacente, plus mince, moins bien individualisée, moins réactive et plus constante dans sa structure que la couche Castor. Certains des éléments structuraux de la paroi intermédiaire décrits ici ont déjà été reconnus chez des Discomycètes Operculés en particulier la stratification fine de la couche Castor (DELAY, 1966; OSO, 1969; WELLS, 1972; MERKUS, 1973-1976; BELLEMERE et MELENDEZ-HOWELL, 1976)

mais la chronologie de leurs modifications au cours du développement n'était pas établie à ce jour.

La différenciation de la **périspore** en plusieurs parties (périspore externe, moyenne et interne) a été précisée. La périspore moyenne, dont l'épaisseur peut varier considérablement selon les spores, est dense au début et très réactive au test Patag; des sphérules grises y apparaissent au cours du développement; à maturité sa texture devient très lâche. La périspore externe est toujours mince. A la base de la périspore interne, la couche support se différencie aussi bien chez les ascospores pigmentées (où elle deviendra la couche de pigmentation) que chez les ascospores albinos.

La limitante externe de l'ascospore reste bien individualisée tout au long du développement.

c - Épiplasme.

Il se caractérise par l'absence totale de globules lipidiques. La quantité de glycogène s'accroît au début et passe par un maximum au cours du stade tertiaire. Des vacuoles se forment autour des jeunes spores, apparemment à partir de saccules de reticulum endoplasmique de l'épiplasme. Elles viennent s'appliquer contre les spores, grossissent et confluent latéralement pour ne plus former qu'une sorte d'unique vacuole dans laquelle baignent les ascospores mûres.

d - Paroi des asques.

Elle comporte un endoascus épais et un exoascus mince. Son développement paraît être maximal au début de la maturation.

L'appareil apical de l'asque semble du même type chez les trois lignées considérées (Pl. XXI).

Jusqu'à leur maturation les ascospores des trois lignées sont donc le siège de plusieurs modifications ultrastructurales simultanées (fig. 3). Ainsi, dans l'épiplasme le taux de glycogène augmente et les vacuoles périsporiques confluent latéralement tandis que dans le sporoplasme on observe une modification des mitochondries, un accroissement du nombre des globules lipidiques, la formation de microvésicules. En même temps des différenciations apparaissent dans la paroi ascosporale : sphérules grises de la périspore moyenne, couche support de la périspore interne, netteté de la lamelle noire, striation longitudinale de la couche Castor. On a vu que les corrélations qui existent nécessairement entre ces transformations, affectant différentes parties de l'ascospore, ne sont pas absolument strictes. D'autre part cet ensemble de transformations préludant à la maturation de l'ascospore est sans relation directe avec la pigmentation puisqu'il est commun à la lignée sauvage, au mutant albinos et au mutant ceinturé.

		STADE PRIMAIRE I	STADE SECONDAIRE II	STADE TERTIAIRE III a	III b	STADE QUATERNAIRE IV a	IV b	IV c
PAROI ASQUE		+	+	+	+	+	+	+
EPI-PLASME	Plasmalemme ascal	+	+	+	+	+	+	+
	Glycogène	+	+ +	+ + +	+ + + + + +	+ +	+	o
	Mitochondries	+	+	+ +	(+ +)	+	(+)	o
	Vacuoles	+	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + + +	+ + + +
	Reticulum	+ +	+	+ +	+	+	+	# o
	Globules lipidiques	o	o	o	o	o	o	o
PAROI SPORE	Limitante externe	+	+	+	+	+	+	+
	Perispore Ext.	ensemble homogène	(+)	+	+	(+)	o	o
	Perispore Moy.			Sphérules grises		Granules + grains	Lâche	# o
	Perispore Int.		o	homogène	Couche support	Couche de transition / Frange / Couche de pigment	C. trans. / Couche de pigment	Couche résidu / Couche de pigment
	Paroi interméd. Couche blanche		o					
	Paroi interméd. Couche Castor							
	Paroi interméd. Couche Pollux		# o	+	+	+	(+)	o ?
	Paroi propre		+	+	+	+	+	+
SPORO-PLASME	Plasmalemme ascosporal							
	Mitochondries							
	Globules lipidiques	o, # o	# o	+	+	+ +	+ + +	+ + +
	Glycogène	+	+ +	+	# o	o	cf ? + + +	cf ? + + +
	Vacuoles	# o	# o	# o	o ?	o ?	o ?	o ?
	Reticulum	+ +	+ +	+	(+)	+	o ?	o ?

Fig. 3. — Schéma récapitulatif du développement des ascospores de la lignée sauvage.

2) Stades de maturation.

▪ - Sporoplasme (fig. 4).

Les processus généraux de maturation sont caractérisés par plusieurs transformations : acquisition d'une structure en chevrons du plasmalemme sporal, modification des parois et des structures internes des mitochondries (conduisant à leur effacement après le test Patag), synthèse de nouveaux globules lipidiques, disposition concentrique des constituants du sporoplasme mûr (avec région périphérique dépourvue d'organites, région moyenne à mitochondries et globules lipidiques, région centrale à granules de réserves). De telles particularités structurales ne semblent pas avoir été signalées jusqu'à présent chez des ascospores mûres. Elles sont peut-être particulières à l'*Ascobolus immersus* mais il se peut aussi qu'elles soient passées plus ou moins inaperçues chez d'autres espèces en raison de la difficulté d'obtention de bonnes coupes d'ascospores mûres et du petit nombre d'études consacrées à la maturation des ascospores.

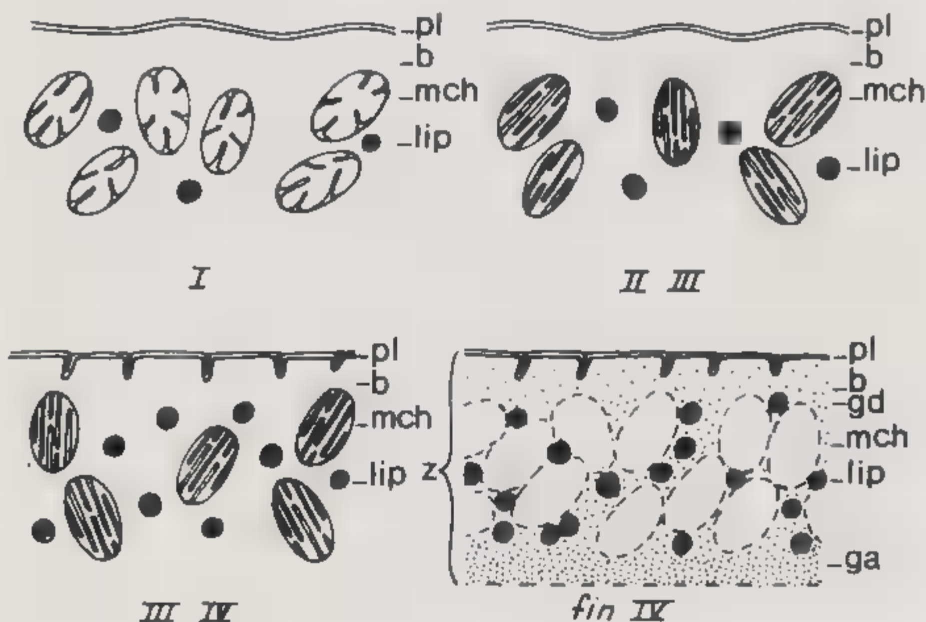


Fig. 4. — Schéma résumant quelques transformations du sporoplasme au cours de la maturation des ascospores chez la lignée sauvage et les mutants ceinturé et albinos. (Les différences de vitesse de maturation du sporoplasme entre les trois lignées n'ont pas été indiquées sur le schéma).

(b, bordure du sporoplasme dépourvue d'organites; ga, granules en amas; gd, granules dispersés; lip, globules lipidiques; mch, mitochondries; pl., plasmalemme; z, zonation du sporoplasme; I, II, III, IV, stades de développement).

Des modifications cytologiques analogues à celles dont il vient d'être question ont été signalées chez divers végétaux. Ainsi, par exemple, l'effacement des structures internes des mitochondries a été constaté lors d'actions de déshydratation de racines de maïs (NIR et al., 1970), ou de pieds de mousses (NOAILLES 1974), ou de feuilles de cotonnier (PHAM THI et VIEIRA DA SILVA, 1980). Dans ce dernier cas, en particulier, les analogies structurales avec les mitochondries des ascospores d'*Ascobolus immersus* sont très grandes. Chez des champignons l'action prolongée de la chaleur (MICHEA-HAMZEHPOUR et al., 1980, *Neurospora crassa*), ou l'anaérobiose sur certains milieux de culture (WALLACE et al., 1968, *Saccharomyces cerevisiae*), provoque aussi un effacement des crêtes mitochondriales.

La présence de multiples invaginations du plasmalemme a été signalée chez des spores de champignons en état de dormance, aussi bien des conidies (*Wallemia sebi*, HAWKER et MADELIN, 1976), que des basidiospores (*Psilocybe* sp., STOCKS et HESS, 1970), ou des ascospores (*Daldinia concentrica*, BECKETT, 1976).

D'après ces données les modifications de structure du sporoplasme des ascospores en maturation de l'*Ascobolus immersus* pourraient témoigner d'une réorganisation structurale en relation avec une déshydratation et une entrée en dormance.

Les chevrons du plasmalemme représentent en quelque sorte une réserve de plasmalemme susceptible de devenir immédiatement fonctionnel par déplissement lors de la germination. Cette particularité structurale semble donc correspondre à une adaptation en vue d'une rapide germination.

b - Paroi ascosporale.

Au cours de la maturation on constate, chez les trois lignées étudiées, qu'une structure plus lâche s'établit dans la périspore moyenne où se forme des concrétions denses aux électrons, et que la périspore externe s'efface progressivement.

Les éléments constitutifs de la paroi intermédiaire (couche blanche, couche Castor, couche Pollux) restent bien individualisés jusqu'à maturité; la couche Castor devient alors plus dense.

Les caractéristiques générales de la paroi propre sont analogues chez les trois lignées.

c - Épiplasme.

Le glycogène régresse de façon analogue au cours de la maturation des ascospores des trois types avec formation corrélative de petites vacuoles sur l'emplacement des amas de granules. Les vacuoles épiplasmiques qui, à la maturité de l'asque, vont confluer en une vacuole unique entourant les ascospores ont donc au moins trois origines différentes : les plus nombreuses proviennent de l'hypertrophie de saccules du reticulum endoplasmique (c'est le cas, en particulier des vacuoles périsporiques); d'autres naissent plus tardivement de la résorbtion des amas de glycogène, d'autres enfin, de la même façon que de petites vacuoles du sporoplasme, proviennent de la régression des mitochondries.

Des mitochondries apparemment fonctionnelles situées à l'intérieur de plages de glycogène ont été observées dans l'épiplasme âgé lorsqu'il est réduit à une mince frange bordant la périspore de l'asque. L'existence d'une telle activité métabolique tardive dans l'épiplasme ne semble pas avoir été jusqu'alors mentionnée.

Au cours de la maturation des ascospores la structure générale du sporoplasme, de la paroi ascosporale et de l'épiplasme n'est donc pas affectée par la présence ou l'absence de pigmentation.

B. - DIFFÉRENCES ULTRASTRUCTURALES OBSERVÉES CHEZ LES TROIS LIGNÉES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DES ASCOSPORES (Fig. 5).

Ces différences portent d'une part sur la pigmentation et d'autre part sur d'autres éléments ultrastructuraux de l'asque.

1) Caractéristiques de la pigmentation.

Malgré l'absence de pigment la maturation des ascospores albinos n'est pas interrompue. La structure d'ensemble de la paroi est conservée; seuls quelques éléments des couches constitutives sont modifiés. La pigmentation est donc un phénomène annexe de la maturation de l'ascospore et non une condition de celle-ci.

L'apparition de la couche de pigmentation se faisant brutalement, ainsi que l'a déjà indiqué DELAY (1966), on pourrait penser que le processus de transformation de la couche support est relativement simple. Mais l'étude précise de la couche de pigmentation et des modalités de son édification laissent supposer qu'il n'en est sans doute pas ainsi. On a vu en effet que la couche de pigmentation présente une certaine complexité chez la lignée sauvage comme chez le mutant ceinturé, avec une croûte différenciée et des structures en flammes. On a vu également que, chez le mutant ceinturé, cette couche montre une sorte de dédoublement au niveau de la ceinture équatoriale.

De plus l'édification de la couche de pigmentation diffère chez les deux lignées pigmentées. Chez la lignée sauvage, on observe la formation de granules faiblement Patag + contenant de petits grains très réactifs, alors que chez le mutant ceinturé seuls sont présents de petits grains dont la morphologie diffère légèrement de ceux de la couche sauvage.

L'individualisation de la couche de pigmentation est donc en soi un processus relativement complexe.

2) Relations entre la pigmentation et les éléments ultrastructuraux de l'asque.

▪ - Différences ultrastructurales antérieures au début de la maturation.

Des processus qui pourraient être en liaison avec la pigmentation sont initiés antérieurement à celles-ci, de façon plus ou moins précoce, puisque certaines

différences ultrastructurales sont observées avant la fin du stade tertiaire du développement des ascospores des trois lignées. Ces différences sont sensibles au niveau du sporoplasme et de l'épiplasme. Dans le **sporoplasme** elles affectent les globules lipidiques dès le stade primaire (apparition plus précoce et plus abondante de ces globules chez le mutant albinos). Elles affectent aussi la différenciation du sporoplasme; celle-ci est accélérée chez le mutant albinos par rapport à la lignée sauvage et plus encore par rapport au mutant ceinturé comparativement au développement de la périspore, de la paroi intermédiaire et de l'épiplasme.

		SAUVAGE	CEINTURÉ	ALBINOS
PAROI ASQUE	stade âgé			
EPIPLASME	vacuoles (stade jeune)	spore	spore	spore
	stade âgé	épiplasme / spore	épiplasme / spore	épiplasme / spore
PAROI SPORE	Perispore moyenne (granulés)			
	couche support	support pigmentation	support pigmentation	support pas de pigment
	Paroi intermed.	couche blanche / castor	couche blanche / castor	couche blanche / castor
SPORO PLASME	Globules lipidiques	#	+	+

Fig. 1 — Tableau schématique résumant les différences observées au cours du développement des ascospores «sauvage», «b2 ceinturé», et «b2 albinos» de l'*Ascobolus immersus*.

Dans **l'épiplasme** c'est la forme et le contenu des vacuoles périsporiques qui diffèrent (vacuoles étroites et à précipités notables chez la souche albinos).

Ceci suppose que les processus qui conduisent à la pigmentation de l'ascospore sont en relation d'une part avec les caractéristiques des globules lipidiques du sporoplasme et d'autre part avec la perméabilité de la limitante externe de la spore qui conditionne pour une part la forme et la nature du contenu des vacuoles épiplasmiques périsporiques.

b. - Différences ultrastructurales contemporaines de la pigmentation.

La transformation de la couche support en couche de pigmentation ne paraît pas en relation directe avec la présence dans la périspore moyenne de granules réactifs aussi bien au test Patag qu'à la réaction à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb. Ces granules en effet sont présents chez les trois lignées. Mais il est assez probable que leur intervention indirecte est en cause puisque leur forme et leur réactivité est différente dans chacun des cas. Ce sont les grains que renferment ces granules qui paraissent le plus directement impliqués dans la pigmentation puisqu'ils sont seuls présents chez toutes les ascospores pigmentées, où d'ailleurs ils diffèrent légèrement de structure.

L'existence d'une couche de transition et d'une frange au contact de la couche de pigmentation ainsi que les caractéristiques ultrastructurales de celle-ci conduisent à admettre qu'un transport des grains par des granules depuis la périspore moyenne vers la couche support est nécessaire à la pigmentation. Dans la couche support les granules peuvent ensuite conserver leur autonomie (cas de la lignée sauvage) ou la perdre (cas du mutant ceinturé). On comprend mal cependant comment, chez la lignée sauvage, s'effectue le franchissement de la périspore interne car le test Patag n'y révèle ni granules ni grains. Quoi qu'il en soit l'intervention de la périspore moyenne dans l'individualisation de la couche de pigmentation paraît acquise.

Au delà de la limite sporale l'épiplasme est aussi impliqué lors de la pigmentation. En effet chez le mutant albinos (et dans une moindre mesure chez le mutant ceinturé) les vacuoles épiplasmiques périsporiques ont une forme différente de celles du sauvage et des précipités s'y accumulent comme s'ils n'étaient pas en mesure de franchir la limitante externe de l'ascospore pour pénétrer dans celle-ci.

Du côté interne de la couche support, des différences associées à la pigmentation affectent la paroi intermédiaire. Chez les lignées pigmentées, on observe en effet que la lamelle noire médiane de la couche blanche s'efface lorsque débute la pigmentation alors qu'elle persiste, au moins un certain temps, chez les ascospores du mutant albinos.

c. - Différences ultrastructurales postérieures à la pigmentation.

Certaines modifications ultrastructurales qui apparaissent au cours de la maturation chez le mutant albinos peuvent être considérées comme étant liées à l'absence de pigment. Ainsi chez le mutant albinos la maturation de la couche

Castor est différée, la surface de l'asque prend un aspect nettement moins onduleux, la périspore interne persiste longuement pendant la maturation, alors qu'elle est lentement envahie par la couche de pigmentation chez la lignée sauvage et plus rapidement chez le mutant ceinturé.

Des différences ultrastructurales qui existaient déjà dans l'asque entre les lignées pigmentées et albinos avant le stade correspondant à la pigmentation, peuvent persister en s'altérant au cours de la maturation. Ainsi, chez la souche albinos, l'épiplasme présente au stade tertiaire des particularités au niveau des vacuoles périsporiques qui paraissent s'atténuer au cours de la maturation (surface sporale moins irrégulière, précipités moins nombreux contre la paroi). On ne peut savoir si ces modifications nouvelles résultent uniquement de l'absence de pigmentation, ou si elles ne sont qu'un aboutissement des différences antérieures indépendant de cette absence, ou si enfin elles résultent des deux à la fois.

Pour ce qui est du sporoplasme les différences de morphologie des granules lipidiques signalées avant la maturation (aspect en passoire chez l'albinos, en oursin chez le ceinturé) persistent jusqu'à la fin de celle-ci.

L'un des buts de cette étude était de rechercher une corrélation entre les différences de pigmentation des lignées étudiées et les différences ultrastructurales qu'elles pourraient présenter pendant le développement et la différenciation des ascospores. L'absence ou l'anomalie de pigmentation des mutants du gène *b2* peut en effet découler d'une anomalie structurale dans la formation de l'ascospore résultant elle-même d'une déficience de la fonction contrôlée par le gène *b2*. Si cette anomalie provoque secondairement le défaut de pigmentation, on peut espérer l'observer dès avant que la pigmentation soit établie. Il faut pourtant garder à l'esprit qu'entre ces lignées, des différences génétiques non contrôlées, sans rapport avec la pigmentation des spores, pourraient être responsables de certaines variations observées dans les modalités de différenciation des ascospores. A priori, si des différences sont observées, on peut s'attendre à ce que celles qui résultent directement des mutations du gène *b 2* soient les plus marquées dans la lignée mutante albinos.

Le sporoplasme (caractères des lipides et vitesse de maturation) et l'épiplasme (caractères des vacuoles périsporiques) manifestent des comportements différents avant même la pigmentation. Dans le cas de l'épiplasme, la modification des vacuoles est la plus marquée chez le mutant albinos; elle l'est dans une moindre mesure chez le mutant ceinturé. Dans le cas du sporoplasme, la maturation est la plus rapide chez le mutant albinos et la plus lente chez le sauvage. Ces différences au niveau du sporoplasme et de l'épiplasme apparaissent comme les plus susceptibles d'être prises en considération dans la mesure où l'intensité de leur variation est corrélée à celle de la pigmentation. Ceci conduit à l'hypothèse suivante.

Chez la lignée sauvage, le pigment serait déposé au niveau de la couche support à partir d'éléments dont au moins une partie proviendrait de l'épiplasme. Le passage de ces éléments serait contrôlé par la limitante externe

(qui persiste tout au long de la maturation); une synthèse des grains intervenant dans la pigmentation se ferait alors dans la périspore; puis ces grains seraient véhiculés par des granules jusqu'à la couche support. L'éventualité de la participation d'éléments venus du sporoplasme reste à démontrer. Cette éventualité est suggérée par la disparition de la lamelle noire. Celle-ci pourrait correspondre à une barrière s'opposant à la venue des précurseurs de pigments depuis le sporoplasme. Pourtant, cette disparition est contemporaine de la pigmentation : on ne peut donc pas exclure que le sporoplasme ne soit pas impliqué et que cette disparition ne soit qu'une conséquence secondaire de l'établissement de la pigmentation.

Les différences observées dans la structure des granules lipidiques du sporoplasme pourraient refléter une différence dans la composition en lipides des trois lignées. Cette différence, si elle n'est pas spécifique du sporoplasme, pourrait altérer la composition des membranes ascosporales; en particulier la limitante externe. Ceci pourrait conduire à des modifications de perméabilité de cette membrane empêchant le passage des précurseurs nécessaires à la pigmentation chez l'albinos et modifiant ce passage chez le ceinturé. L'accélération de la maturation du sporoplasme pourrait être une autre conséquence de la modification de la composition lipidique sans être pour cela directement liée à la pigmentation.

Dans une telle hypothèse, le gène *b2* interviendrait dans la composition lipidique de l'ascospore. A la suite de la mutation de ce gène, l'absence de pigmentation ne serait qu'une manifestation secondaire, bien que spectaculaire, de la modification de cette composition lipidique.

Davantage d'observations permettront de préciser et de compléter ce travail. Nous disposons avec *Ascobolus* d'un matériel dont le cycle est parfaitement contrôlé dans les conditions du laboratoire. Des mutants d'ascospore ont été isolés dans de nombreux gènes. Chacun de ces gènes doit toucher une fonction précise intervenant de manière directe ou indirecte dans la différenciation des ascospores. Ainsi, les meilleures conditions sont réunies pour l'étude de la différenciation des ascospores chez cet Ascomycète.

REMERCIEMENTS

L'assistance technique de M.C. Malherbe, H. Chacun pour les coupes, M. Letalnet et E. Vast pour les photographies, T. Casses pour les dessins, ainsi que de M. André et E. Rodier pour la frappe du manuscrit a été très appréciée.

BIBLIOGRAPHIE

AL-RIKABI K.H., 1976 — Études sur la structure des parois de deux souches du champignon *Drechslera sorokiniana*. Thèse de spécialité, Université de Nancy I.

AL-RIKABI K.H. et BONALY R., 1977 — Composition chimique et dégradation des parois d'une souche sauvage et d'un mutant blanc du champignon *Drechslera sorokiniana*. *Can. J. Mic.* 23, 11 : 1508-1517.

AL-RIKABI K.H., BONALY R. et REISINGER O., 1979 — Biodégradation et altération enzymatique de la paroi de *Drechslera sorokiniana* et de son mutant albinos. Étude ultrastructurale. *Ann. Sc. Nat. Bot.* 13ème sér., 1 : 39-50.

BECKETT A., 1976 — Ultrastructural studies on exogenously dormant ascospores of *Daldinia concentrica*. *Can. J. Bot.* 54, 8 : 689-697.

BELLEMERE A. et MELENDEZ-HOWELL L.M., 1976 — Étude ultrastructurale comparée de l'ornementation externe de la paroi des ascospores de deux Pézizales : *Peziza fortini* n. sp., récoltée au Mexique, [redacted] *Aleuria aurantia* (Oed. ex Fr.) Fuck. *Rev. de Mycol.* 40 : 3-19.

BULL A.T., 1970 — Chemical composition of wild type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituants. *J. Gen. Mic.* 63 : 75-94.

BULL A.T. et FAULKNER B.M., 1965 — Melanin synthesis in wild type and mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Mic.* 41 : IV.

CAMPBELL R., 1970 — Ultrastructure of an albino strain of *Alternaria brassicicola*. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 54, 2 : 309-312.

CAMPBELL R., LARNER R.W. et MADELIN M.F., 1968 — Notes on an albino mutant of *Alternaria brassicicola*. *Mycol.* 60 : 1122-1125.

CARROLL G.C., 1967 — The ultrastructure of ascospore delimitation in *Saccobolus kervernii*. *J. Cell. Biol.* 33, 1 : 218-224.

DECARIS B., FRANCOU F., KOUASSI A., LEFORT C. and RIZET G., 1981 — Genetic instability in *Ascobolus immersus* : modalities of back mutations, intragenic mapping of unstable sites and unstable insertion. Preliminary biochemical data. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 45 : 509-517.

DELAY C., 1966 — Étude de l'ultrastructure de l'asque de l'*Ascobolus immersus* Pers. pendant la maturation des spores. *Ann. Sc. Nat., Bot. Biol. Vég.* 7, 2 : 361-378.

HACKETT C.J. et CHEN K.C., 1976 — Ultrastructure of developing ascospores in *Sordaria brevicollis*. *J. Bact.* 126, 2 : 883-894.

HAWKER L.E. et MADELIN M.F., 1976 — The dormant spore. *In* The fungus spore : form and function : 1-72 (WEBER D.J. et HESS W.M. editors). Wyley ed., New York.

LEBLON G., 1972b — Mechanism of gene conversion in *Ascobolus immersus*. II. The relationship between the genetic alteration in *b1* or *b2* mutants and their conversion spectrum. *Mol. Gen. Genet.* 116 : 322-335.

LISSOUBA P., MOUSSEAU J., RIZET G. and ROSSIGNOL J.L., 1962 — Fine structure of genes in the Ascomycete *Ascobolus immersus*. *Adv. Genet.* 11 : 343.

MASAGO H., 1961 — Effects of radiations on microorganisms with special references to the effect on *Helminthosporium oryzae*. *Spec. Pub. Lab. Pl. Path.*, Kyoto Univ. 14 : 1-15.

MERKUS E., 1973-1976 — Ultrastructure of the ascospore wall in Pezizales (Ascomycetes) I-II-III-IV. *Persoonia* 7 : 351-366; 8 : 1-22; 8 : 227-247; 9 : 1-38.

MICHEA-HAMZEHPOUR M., GRANGE F., TONTHAT T.C. et TURIAN G., 1980 — Heat induced changes in respiratory pathway and mitochondrial structure during microcycle conidiation of *Neurospora crassa. Arch. Microbiol.* 125 : 53-58.

NICOLAS A., ARNAISE S., HAEDENS V. and ROSSIGNOL J.L., 1981 – Ascospore mutants and Genetic map of *Ascobolus immersus* stock 28. *J. Gen. Microbiol.* 125 : 257-272.

NIR I., POLJAKOFF-MAYBER A. et KLEIN S., 1970 – The effect of water stress on mitochondria of root cells. *Plant Physiol.* 45 : 173-177.

NOAILLES M.C., 1974 — Comparaison de l'ultrastructure du parenchyme des tiges et feuilles d'une mousse normalement hydratée et en cours de dessiccation (*Pleurozium schreberi* (Willd.) Mitt.). *C.R.Ac. Sc.* Paris, 278, sér. D : 2759-2762.

OLAH G.M., COLE G.T. et REISINGER O., 1977 — Le rôle et la nature chimique des microvésicules sécrétoires dans l'apex hyphal et dans les cellules sporogènes. *Ann. Sc. Nat.* 18, 4 : 301-318.

OSO B.A., 1969 — Electron microscopy of ascus development in *Ascobolus. Ann. Bot.* 33 : 205-209.

PHAM THI A.T. et VIEIRA DA SILVA J., 1980 — Influence de la sécheresse sur l'ultrastructure mitochondriale chez le cotonnier. Quelques implications métaboliques. *Z. Pflanzenphysiol.* 104, 4 : 351-358.

REEVES F. Jr., 1967 — The fine structure of ascospore formation in *Pyronema domesticum. Mycologia* 59, 6 : 1018-1033.

REYNOLDS E.S., 1963 — The use of lead citrate at high pH as [redacted] electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17, 7 : 208-212.

RIZET G., ENGELMAN N., LEFORT C., LISSOUBA P. and MOUSSEAU J., 1960 — Sur un Ascomycète intéressant pour l'étude de certains aspects du problème de la structure du gène. *C.R.Ac. Sc.* Paris, 270 : 2050-2052.

RIZET G., ROSSIGNOL J.L., LEFORT C., 1969 — Sur la vérité et la spécificité des spectres de ségrégations chez *Ascobolus immersus. C.R.Ac. Sc.* Paris, sér. D, 269 : 1427-1430.

ROSSIGNOL J.L., PAQUETTE N., NICOLAS A., 1979 – Aberrant 4:4 asci; Disparity in the direction of conversion and frequencies of conversion in *Ascobolus immersus.* Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. Vol. XLIII : 1343-1352.

SCHRANTZ J.P., 1966 — Contribution à l'étude de la paroi sporale chez *Pustularia cupularis. C.R.Ac. Sc.* Paris, 262, Sér. D : 1212-1215.

SCHRANTZ J.P., 1970 — Étude cytologique en microscopie optique optique et électronique de quelques Ascomycètes II. La paroi. *Rev. Cytol. Biol. Vég.* 33 : 111-168.

SPURR A.R., 1969 — A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *J. Ultr. Res.* 26 : 41-43.

STOCKS D.L. et HESS W.M., 1970 — Ultrastructure of dormant and germinated basidiospores of a species of *Psilocybe. Mycologia* 62, 1 : 176-191.

THIERY J.P., 1967 — Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie* 6 : 987-1018.

WALLACE P.G., HUANG M. et LINNANE A.W., 1968 — The biogenesis of mitochondria II. The influence of medium composition on the cytology of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae. J. Cell. Biol.* 37, 2 : 207-220.

WELLS K., 1972 — Light and electron microscopic studies of *Ascobolus stercorarius* II. Ascus and ascospore ontogeny. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 62 : 1-93.

ZICLER D., 1973 — La Méiose et les Mitoses au cours du cycle de quelques Ascomycètes.

Thèse Doctorat ès-Sciences, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay.

ZICKLER D. et SIMONET J.M., 1980 — Identification of gene controlled steps of ascospore development in *Podospora anserina*. *Experimental Mycology* 4 : 191-206.

ABRÉVIATION DES LÉGENDES DES PLANCHES

Sur les planches l'échelle de référence correspond à 1 μm, sauf avis contraire.

a	aires claires dans la périspore moyenne
alb	spore albinos
c	ceinture pigmentée de l'ascospore
cb	couche blanche
cc	couche Castor
ceint	spore ceinturée
cp	couche Pollux
cr	couche résiduelle au-dessus de la couche de pigmentation
crt	croûte de la couche de pigmentation
cs	couche support
ct	couche de transition
e	épiplasme
el	éléments subglobuleux dans la périspore moyenne
en	endoascus
ex	exoascus
f	frange de la couche de pigmentation
fl	flammes de la couche de pigmentation
gl	globules lipidiques
gm	grains dans la périspore moyenne
gs	globules sphériques dans la périspore moyenne
gv	granules dans les vacuoles
int	paroi intermédiaire
lb	lamelle blanche
le	limitante externe
li	limitante interne (= plasmalemme sporal)
ln	lamelle noire
m	mitochondrie
p	paroi de l'asque
pa	paroi ascosporale
pe	périspore externe
per	périspore
pg	couche de pigmentation
pi	périspore interne
pig	pigment
pl	plasmalemme
pm	périspore moyenne
pp	paroi propre de la spore
pr	précipité
ps	plasmalemme sporal
pv	précipité dans les vacuoles
r	reticulum endoplasmique
s	sporoplasme
sauv	spore sauvage
sb	sous-couche basilaire de la couche de pigmentation
sg	sphérules grises dans la périspore
sm	sous-couche submédiane de la couche de pigmentation
st	sous-couche tectale de la couche de pigmentation
v	vacuole
vp	vacuole périsporique

LÉGENDES DES PLANCHES

Pl. I. — A, B : Aspect des ascospores mûres chez la lignée sauvage et les mutants ceinturé et albinos. Le caractère de forme de spores (ovale - rond) dépend d'un gène indépendant du gène *b2* de couleur de spores.

Pl. II. Lignée sauvage. Stade primaire du développement des ascospores (Patag). - A : Aspect d'ensemble. - B : Détail du plasmalemme sporal et de la limitante externe de l'ascospore à un stade déjà avancé du développement (épiplasme déja riche en glycogène). Remarquer l'aspect particulier du reticulum endoplasmique de l'épiplasme au contact de la paroi ascosporale. - C : Détail du sporoplasme [redacted] de l'épiplasme. - D : Mitochondries en haltère dans l'épiplasme.

Pl. III. — Lignée sauvage. Stade secondaire du développement des ascospores (Patag). - A : Sporoplasme, paroi ascosporale et épiplasme. Une des vacuoles de l'épiplasme renferme un précipité. - B : Détail d'une partie de la paroi ascosporale. Une vacuole de l'épiplasme est étroitement appliquée contre la limitante externe de l'ascospore. Périspore externe, périspore moyenne et paroi intermédiaire bien distinctes. - C : Épiplasme et paroi de l'asque. Amas de glycogène dans l'épiplasme. Exoascus très apparent. - D : Détail du sporoplasme. Abondance relative du glycogène et des mitochondries. Rareté des lipides. Reticulum endoplasmique distinct.

Pl. IV. — Lignée sauvage. Début du stade tertiaire du développement des ascospores. Sections du sporoplasme à l'épiplasme. - A (Patag) : Sporoplasme riche en globules lipidiques et en mitochondries. Glycogène en grains dispersés. Lamelle noire de la couche blanche très distincte. Périspore interne bien individualisée. Sphérules grises dans la périspore moyenne. Épiplasme riche en mitochondries et en glycogène. - B (Acétate d'uranyle et citrate de plomb) : Stade sans doute un peu plus jeune que le précédent sans sphérules grises dans la périspore moyenne. Périspore interne, ici discontinue, très réactive, au-dessus de la couche blanche claire et de l'ensemble des couches Castor et Pollux très réactif. Précipités dans les vacuoles du sporoplasme. Mitochondries de l'épiplasme très réactives dans les plages claires d'aspect vésiculeux du glycogène. Paroi propre faiblement différenciée en trois régions.

Pl. V. — Lignée sauvage. Début du stade tertiaire de développement des ascospores. Détails. - A (Patag) : Paroi intermédiaire et périspore interne. La striation transversale de la couche Castor est très nette. La couche blanche, ceinturée de la lamelle noire n'apparaît pas nettement (coupe un peu plus oblique). - B (Acétate d'uranyle - citrate de plomb) : Les couches Castor et Pollux ainsi que la périspore interne sont très réactives. La couche blanche ne montre pas de différenciation médiane. - C (Patag) : Fusion latérale de vacuoles épiplasmiques étroitement appliquées contre la limitante externe de l'ascospore. Périspore externe d'aspect clair, bien distincte. - D (Acétate d'uranyle - citrate de plomb) : Saccules du reticulum endosplasmique de l'épiplasme au contact de la limitante externe de l'ascospore. Des sphérules grises, réactives, dans la périspore moyenne. Périspore externe, réactive, mal délimitée vers sa base. - E (Patag) : Sporoplasme avec divers stades de développement des globules lipidiques. - F (Patag) : Sporoplasme avec microvésicules assez volumineuses. - G (Patag) : Épiplasme. Aspect irrégulier du plasmalemme ascal. Mitochondrie très allongée dans un amas de glycogène; vacuoles avec granule interne.

Pl. VI. Lignée sauvage. Stade tertiaire avancé du développement des ascospores. - A (Patag) : Paroi de l'ascospore et épiplasme. Périspore moyenne bien développée sans sphérules grises distinctes. Épiplasme peu riche en glycogène. - B (Patag) : Plasmalemme ascosporal à aspect en chevrons. - C (Patag) : Sporoplasme avec mitochondries nombreuses à crêtes fines et subparallèles; reticulum endoplasmique à aspect particulier. - D (Acétate d'uranyle - citrate de plomb) : Paroi intermédiaire et périspore interne. Couche Pollux très dense. Couche Castor finement stratifiée. Couche blanche claire. Périspore interne dense et réactive avec ébauche, à sa base, de la couche support. - E (Patag) : Coupe analogue à D. Remarquer les différences de réaction des divers constituants de la paroi.

Pl. VII. – Lignée sauvage. Apparition de la couche de pigmentation en début de maturation des ascospores (Patag). - A : Section depuis la paroi propre de l'ascospore jusqu'à l'épiplasme. La couche de pigmentation est déjà épaisse. Remarquer les granules de la frange, de la couche de transition et des aires claires de la périspore moyenne. Par contre la périspore interne a un aspect très homogène. - B : Détail de A. (A ce niveau la frange est quasi absente). Remarquer la striation longitudinale encore distincte dans la couche Castor, la striation transversale dans la couche blanche, où la lamelle noire a disparu. Les granules de la couche de pigmentation renferment des grains. Une croûte et des flammes sont distinctes dans la couche de pigmentation. La matrice de la périspore moyenne forme des masses grisâtres.

Pl. VIII. – Lignée sauvage. Stade de pigmentation déjà avancé, au cours de la maturation (Patag). - A : Section depuis le sporoplasme jusqu'à la paroi de l'asque. La couche de pigmentation est très apparente. La périspore moyenne encore relativement dense est épaisse. Sur cette coupe les vacuoles épiplasmiques périsporiques ne sont pas encore bien développées. - B : Détail de la couche de pigmentation. A ce niveau la périspore interne est discontinue: la couche de transition vient au contact de la couche de pigmentation. Dans celle-ci croûte et flammes s'affirment. La couche Castor a un aspect très dense. - C : Détail du sporoplasme. L'ultrastructure des mitochondries est devenue indistincte. Les globules lipidiques sont peu réactifs. De nombreux granules (cf. glycogène?) entourent les mitochondries. Sous le plasmalemme en chevrons (peu distinct au niveau de cette coupe) la bordure du sporoplasme est dépourvue d'organites. - D : Aspect beaucoup moins différencié du sporoplasme qui peut être rencontré alors que la couche de pigmentation est du type de A et B. Cet aspect est fréquent au début de la pigmentation ou à la fin du stade tertiaire (plasmalemme onduleux sans chevrons).

Pl. IX. – Lignée sauvage. Ascospores en fin de maturation (Patag). - A : Section depuis le sporoplasme jusqu'à la paroi de l'asque. La périspore devient lâche; les vacuoles épiplasmiques périsporiques ont conflué en une vacuole unique : l'épiplasme se réduit à une frange à la périphérie de l'asque. - B Détail de l'épiplasme. Le glycogène est encore abondant; des mitochondries sont présentes, parfois allongées. - C : Détail de la couche de pigmentation et de la périspore. La périspore moyenne est lâche; la couche de pigmentation et la couche Castor sont devenues très denses. - D : A un stade plus âgé l'épiplasme se réduit à des corps paramuraux; la vacuole périsporique contient des précipités denses de forme irrégulière.

Pl. X. – Lignée sauvage. Ascospores en fin de maturation (Patag) (suite). - A : Région de contact entre trois ascospores (l'une, à droite, n'est représentée que par sa périspore). Remarquer les périspores moyennes de texture lâche contenant des globules sphériques gris et des précipités irréguliers, de forme et de taille variées, très denses aux électrons; la limitante externe des ascospores est très distincte; la maturation du sporoplasme est avancée. - B : Détail du sporoplasme mûr. Les mitochondries ne présentent plus d'ultra-

structure distincte; les globules lipidiques sont de deux types; le plasmalemme sporal est en chevrons et sa bordure est dépourvue d'organites. - C : Détail du plasmalemme sporal, de sa bordure et des constituants du sporoplasme: les lipides sont de deux types.

Pl. XI. — Lignée sauvage. Divers stades de maturation des ascospores (Acétate d'uranyle - citrate de plomb). - A : Couche de pigmentation et périspore d'une ascospore vers la fin de la maturation. La périspore moyenne contient des globules subsphériques à partie centrale homogène, grise, entourée de granules denses. - B : Couche de pigmentation d'une ascospore en cours de pigmentation. La périspore interne est discontinue; la couche de transition est épaisse. Les flammes de la couche de pigmentation sont bien visibles. - C : Détail de B. La coupe intéresse une région où la périspore interne n'est plus distincte. La croûte de la couche de pigmentation est apparente. - D : Couche de pigmentation devenue assez dense. A ce niveau la périspore interne est encore présente. A ce grossissement la couche Pollux est difficilement distincte; la couche Castor est devenue très dense. - E : Détail des globules lipidiques de la périspore en fin de maturation des ascospores. La texture de la périspore est tout à fait lâche. Autour de la région centrale des globules, grise, les granules perdent leur réactivité (cf. A) et probablement s'effacent.

Pl. XII. — Mutant ceinturé. Stades primaire, secondaire et jeune stade tertiaire du développement des ascospores (Patag). - A : Section du sporoplasme à l'épiplasme (cf. lignée sauvage, Pl. II-A). - B : Stade primaire. Détail de la paroi ascosporale (cf. lignée sauvage, Pl. II-B). La présence, à ce stade, de globules lipidiques aussi gros n'a pas été observée chez le sauvage. - C : Stade secondaire. Détail de la paroi ascosporale (cf. lignée sauvage, Pl. III-A). Remarquer, dans les vacuoles épiplasmiques périsporiques, de fins précipités non observés chez la lignée sauvage. La périspore externe et la limitante externe sont distinctes. - D : Stade secondaire. Détail de la jeune paroi intermédiaire (cf. lignée sauvage, Pl. III-B). La striation transversale et longitudinale de la paroi intermédiaire est nette. - E : Jeune stade tertiaire. Paroi propre, paroi intermédiaire et périspore (cf. lignée sauvage, Pl. IV-A). Remarquer aussi la lamelle noire. - F : Jeune stade tertiaire. Mitochondrie dans le sporoplasme. Comme chez la lignée sauvage les mitochondries du jeune sporoplasme ont des crêtes peu nombreuses et assez épaisses (cf. lignée sauvage, Pl. III-D). - G : Jeune stade tertiaire. Épiplasme (cf. lignée sauvage, Pl. V-C). Comme chez la lignée sauvage les plages de glycogène contiennent des mitochondries: les vacuoles épiplasmiques périsporiques ont même origine.

Pl. XIII. — Mutant ceinturé. Stade tertiaire avancé du développement des ascospores (Patag). - A : Sporoplasme d'un stade tertiaire peu avancé (cf. lignée sauvage, Pl. VI-C). Les mitochondries ont des crêtes fines, nombreuses, subparallèles. - B : Épiplasme (cf. lignée sauvage, Pl. VI-A). Remarquer les sphérules claires dans la périspore moyenne. Noter aussi (comme chez la lignée sauvage) l'apparition de vacuoles sur l'emplacement de plages de glycogène. - C : Paroi intermédiaire (cf. lignée sauvage, Pl. VI-E). Noter la stratification de la couche Castor et la réactivité de la lamelle noire. - D : Sporoplasme d'un stade tertiaire bien avancé (cf. lignée sauvage, Pl. VI-B). L'aspect du plasmalemme en chevrons est déjà bien différencié. Les globules lipidiques sont abondants, les uns peu réactifs, à centre clair, les autres en oursin grossier.

Pl. XIV. — Mutant ceinturé. Début de la pigmentation (Patag). - A : Section d'ensemble de la région de la ceinture. - B : Détail de la ceinture. La sous-couche tectale discontinue est formée de gros granules parfois contigus. La sous-couche submédiane est claire. La sous-couche basilaire montre des flammes et une croûte supérieure. - C : Section d'ensemble entre la paroi propre de l'ascospore et la paroi de l'asque, à un stade déjà avancé. La périspore moyenne renferme de nombreux éléments globuleux (cf. Pl. VII-A). - D : Détail de la couche de pigmentation dans la région de la ceinture. Au contraire de la lignée sauvage

les sous-couche tectale et basilaire sont uniquement formées de grains (cf. Pl. VII-B). La sous-couche tectale est ici au contact direct de la périspore interne (cf. Pl. VIII-A). La couche blanche n'a pas de lamelle noire médiane. La couche Castor est déjà dense.

Pl. XV. — Mutant ceinturé. Développement de la ceinture au cours de la maturation des ascospores (Patag). - A : La sous-couche tectale forme un revêtement continu. - [redacted] : Raccordement latéral de la ceinture à la couche de pigmentation banale. - C : Dépôts fins et nombreux dans la sous-couche submédiane de la ceinture. - D: Dépôts peu nombreux, mais volumineux et irréguliers, dans la sous-couche submédiane de la ceinture.

Pl. XVI. — Mutant ceinturé. Maturation des ascospores (Patag). - A : Détail des éléments globuleux dans la périspore moyenne [redacted] cours de la maturation (cf. Pl. XIV-C; VII-A). - B : Aspect particulier de l'épiplasme chez les spores presque mûres. Les hernies ne sont pas observées chez la lignée sauvage (cf. Pl. IX-A). - C : Sporoplasme d'une ascospore mûre. Les mitochondries sont analogues à celles de la lignée sauvage au même stade (cf. Pl. X-B). - D : Détail du sporoplasme mûr. L'aspect en chevrons du plasmalemme n'apparaît pas nettement sur cette section. Remarquer les deux types de globules lipidiques : en oursin et à centre clair (fragiles) différant de ceux de la lignée sauvage (cf. Pl. X-B, C). - E : autre détail du sporoplasme. Les grains de fond sont différents des granules entourant les mitochondries.

Pl. XVII. — Mutant albinos. Stades primaire et secondaire du développement des ascospores. - A Stade primaire (Patag). Les globules lipidiques sont plus fréquents dans le sporoplasme que chez la lignée sauvage et le mutant ceinturé (cf. Pl. II-A; XII-B, C). - B : Stade secondaire (Patag). Ébauche de la paroi intermédiaire. L'aspect sombre de la partie centrale du granule lipidique est particulier au mutant albinos (cf. Pl. III-D; XII-B). - C : Stade secondaire (Acétate d'uranyle - citrate de plomb). Ébauche de la paroi intermédiaire avec striation transversale. - D : Stade secondaire (Patag). Développement d'une stratification superposée à la striation initiale dans la paroi intermédiaire.

Pl. XVIII. — Mutant albinos. Stade tertiaire du développement des ascospores. - A (Patag) Section d'ensemble d'un jeune stade tertiaire depuis la paroi propre de l'ascospore jusqu'à la paroi de l'asque. Remarquer la lamelle noire de la couche intermédiaire et les précipités assez volumineux dans les jeunes vacuoles épiplasmiques périsporiques (cf. sauvage, Pl. IV-A; ceinturé, Pl. XIII-B). - B (Patag) : Détail paroi intermédiaire (avec couche Pollux, couche Castor, couche blanche et lamelle noire), périspore interne, avec ébauche de couche support (cf. sauvage Pl. V-A; ceinturé Pl. XIII-C). - C (Patag) : Paroi intermédiaire et périspore d'un stade plus avancé. La périspore plus abondante contient des sphérules grises (cf. sauvage, Pl. IV-A; ceinturé, Pl. XIII-B). - D : (Acétate d'uranyle - citrate de plomb) : Périspore moyenne avec sphérule grise, périspore externe peu distincte et limitante externe (cf. sauvage, Pl. V-D). - E (Patag) : Sporoplasme avec mitochondries à nombreuses crêtes fines (cf. sauvage, Pl. VI-C; ceinturé, Pl. XIII-A).

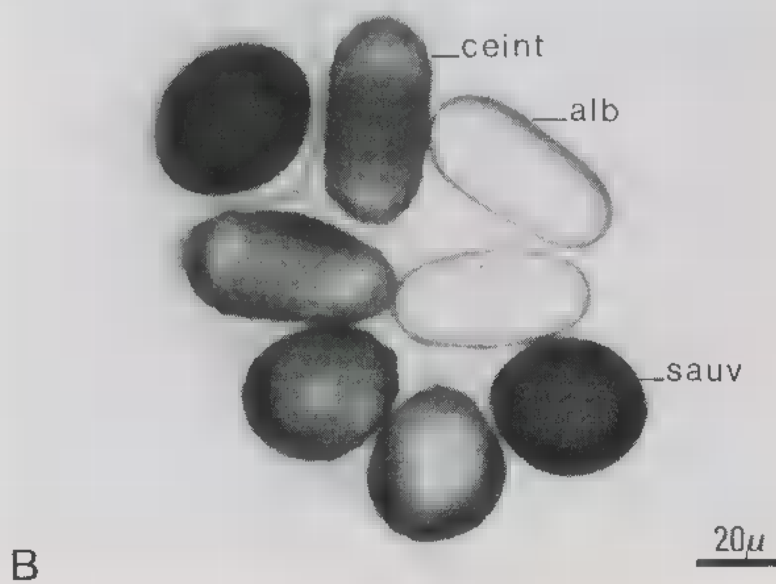
Pl. XIX. — Mutant albinos. Début de maturation (correspondant au début de pigmentation des souches pigmentées). - A (Patag) : Section d'ensemble de la paroi ascosporale. La périspore moyenne renferme de nombreux granules Patag +. Des précipités abondants adhèrent à la limitante externe de l'ascospore. Le plasmalemme ascosporal a un aspect en chevrons (cf. sauvage, Pl. VI-D, VII-A; ceinturé, Pl. XIV-C). - B (Patag) : Détail de la paroi intermédiaire et de la périspore interne. Dans cette dernière la couche support est distincte. Dans la couche blanche la lamelle noire persiste (elle est peu typique en raison de l'obliquité de la coupe) (cf. sauvage, Pl. VII-B; ceinturé, Pl. XIV-B). - C (Acétate d'uranyle - citrate

de plomb) : Contact entre une ascospore et l'épiplasme. La surface de l'ascospore est hérissée d'apophyses étroites et couverte de précipités denses déposés initialement dans les vacuoles périsporiques devenues coalescentes. Stade un peu plus jeune que A. - D (Acétate d'uranyle - citrate de plomb) : Détail des granules de la périspore moyenne.

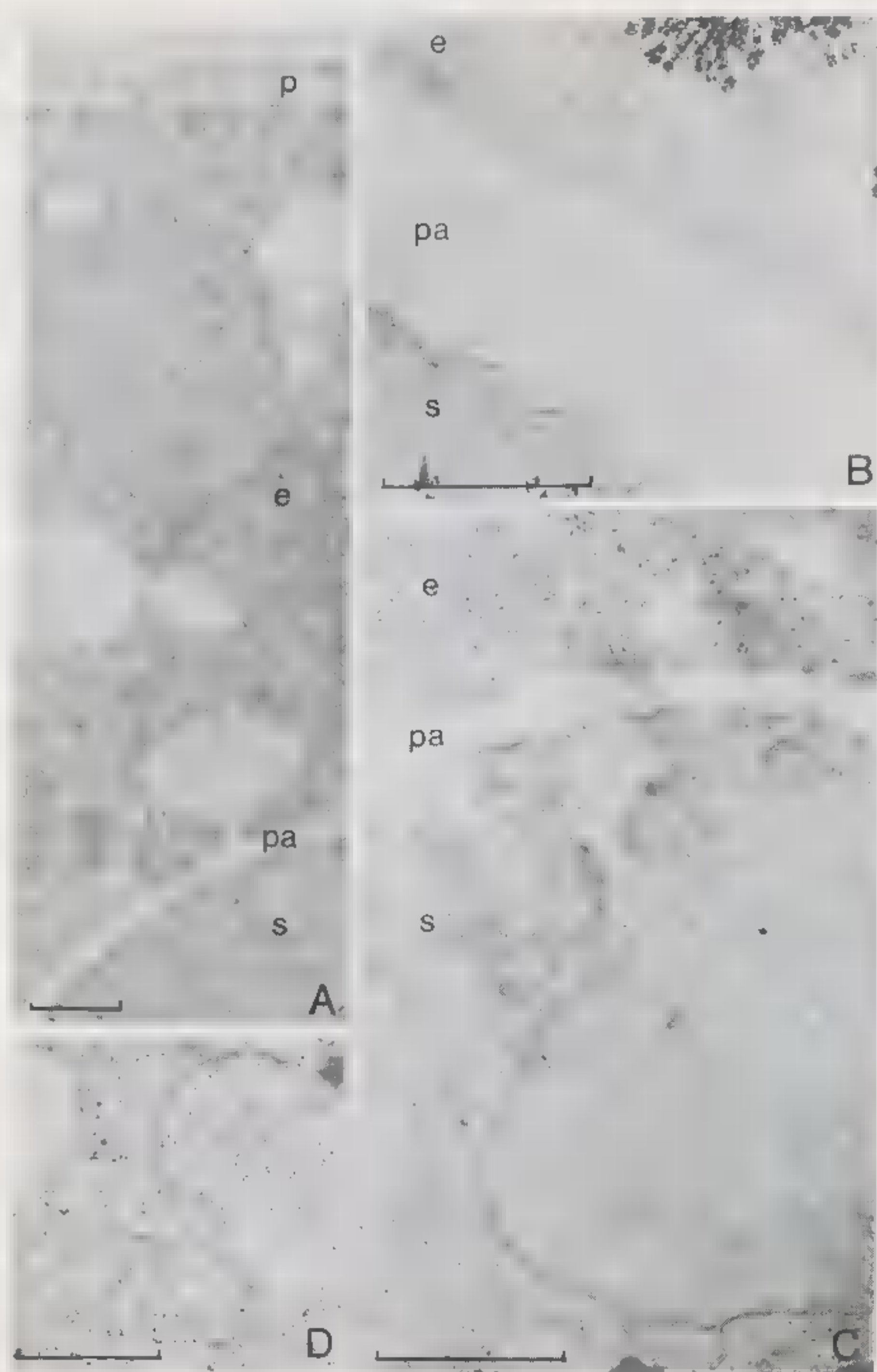
Pl. XX. — Mutant albinos. Maturation des ascospores. - A (Patag) : Début de maturation. Détail du sporoplasme (cf. Pl. XIX-A). Plasmalemme ascal en chevrons. - B (Patag) : Début de maturation. Détail du sporoplasme (cf. A.). Globules lipidiques en passoire (cf. sauvage, Pl. X-A, B; ceinturé, Pl. XIII-D). - C (Patag) : Maturation avancée. Détail de la paroi. La périspore interne, homogène reste dense. La périspore moyenne est lâche. La stratification de la couche Castor est encore distincte. La lamelle noire persiste dans la couche blanche (cf. sauvage, Pl. IX-C; ceinturé, Pl. XIV-B). - D (Acétate d'uranyle - citrate de plomb) : Maturation avancée. Détail de la paroi (cf. sauvage, Pl. XI- A à D). Par cette coloration la lamelle noire de la couche blanche n'est pas réactive. - E (Patag) : Maturation avancée. Détail du sporoplasme. Les mitochondries ont perdu leur réactivité. Les globules lipidiques sont de deux types (en passoire ou à centre dense) (cf. A, B; cf. sauvage, Pl. X-B, C; ceinturé, Pl. XVI-B, E). - F (Patag) : Maturation avancée. Détail de la paroi ascosporale. La périspore interne est dense. La couche Pollux reste distincte. La couche Castor est peu différenciée. Dans la couche blanche la ligne noire persiste mais elle est indistincte dans la partie gauche de la coupe, sectionnée obliquement.

Pl. XXI. — Appareil apical de l'asque (Patag). - A : Lignée sauvage. Fin du stade secondaire de développement des ascospores. Remarquer l'importance de la vacuole épiplasmique apicale. - B : Mutant ceinturé. Stade primaire ou secondaire de développement des ascospores. L'exoascus est différencié au niveau de l'encoche de l'appareil apical. - C : Lignée sauvage. Début du stade tertiaire du développement des ascospores. Noter, au niveau de l'encoche de l'appareil apical, l'abondance de reticulum endoplasmique dans l'épiplasme et la différenciation de l'exoascus.

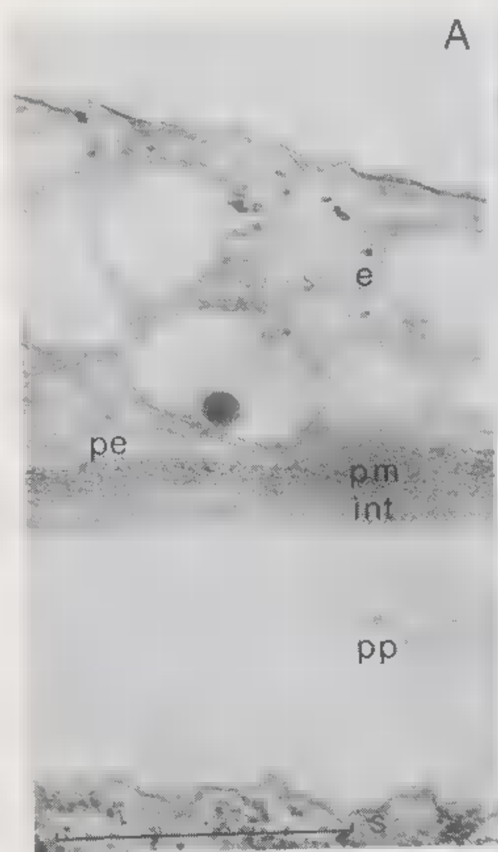


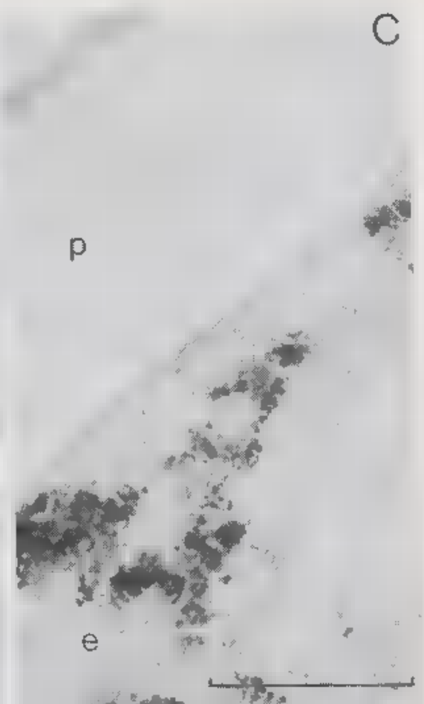


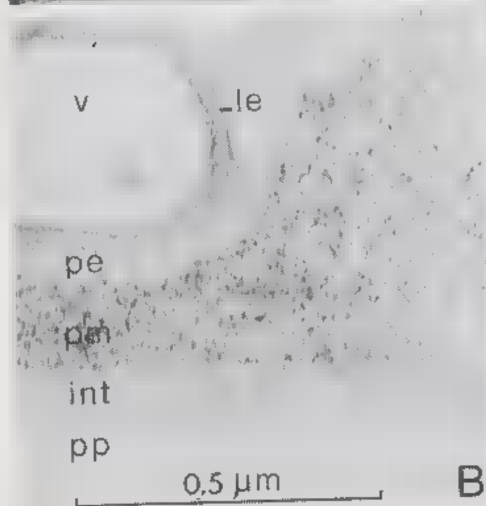
Pl. I

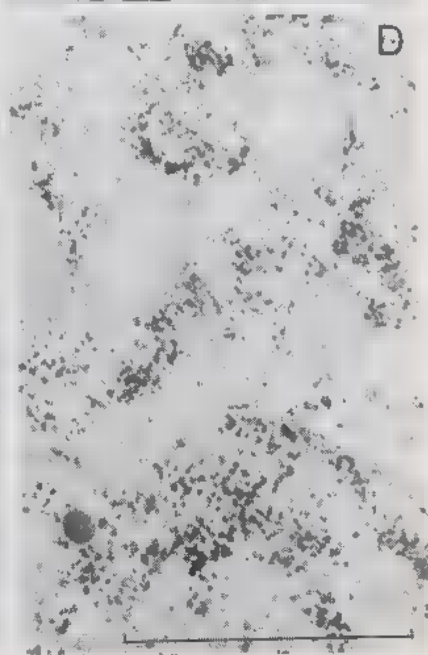


Pl. II

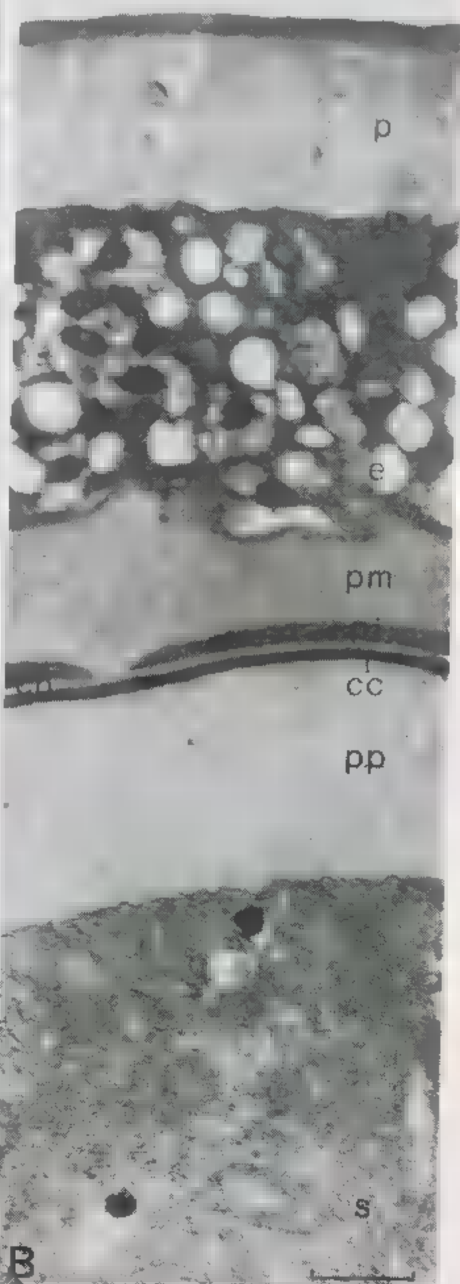




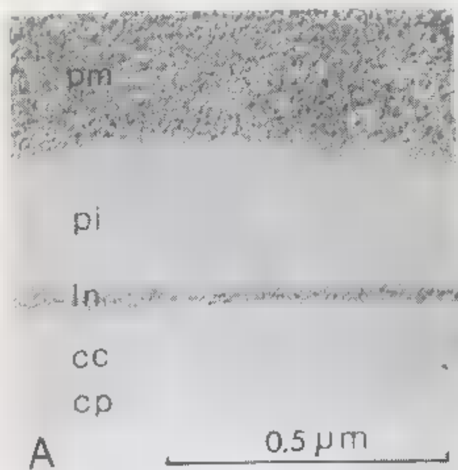


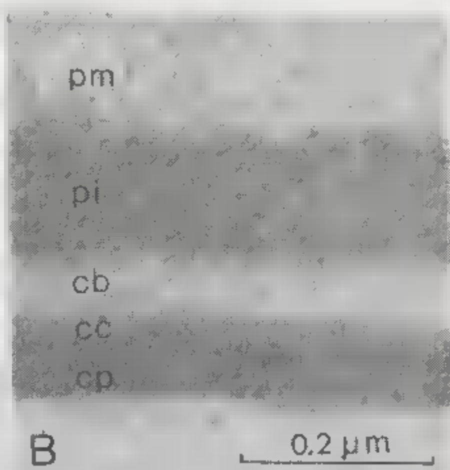


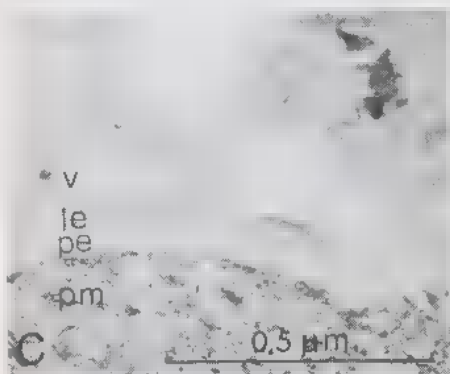
Pl. III

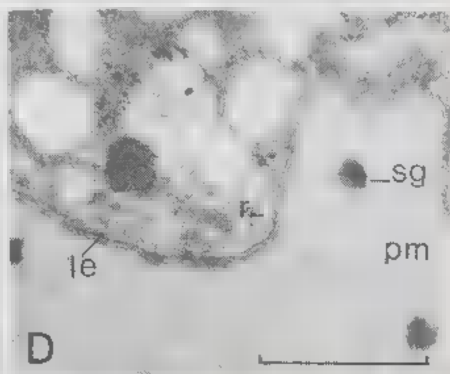


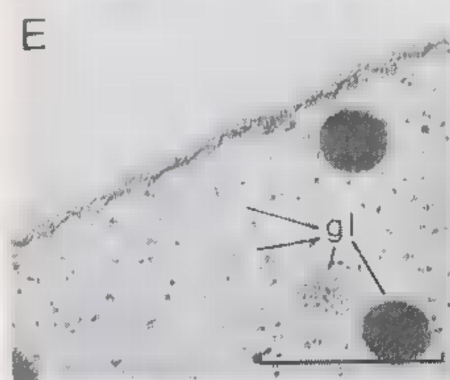
Pl. IV

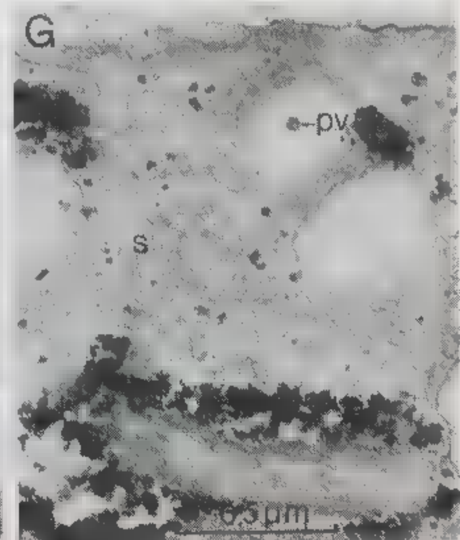

pm
pi
ln
cc
cp
A
0.5 µm


pm
pi
cb
cc
cp
B
0.2 µm


v
le
pe
pm
C
0.5 µm

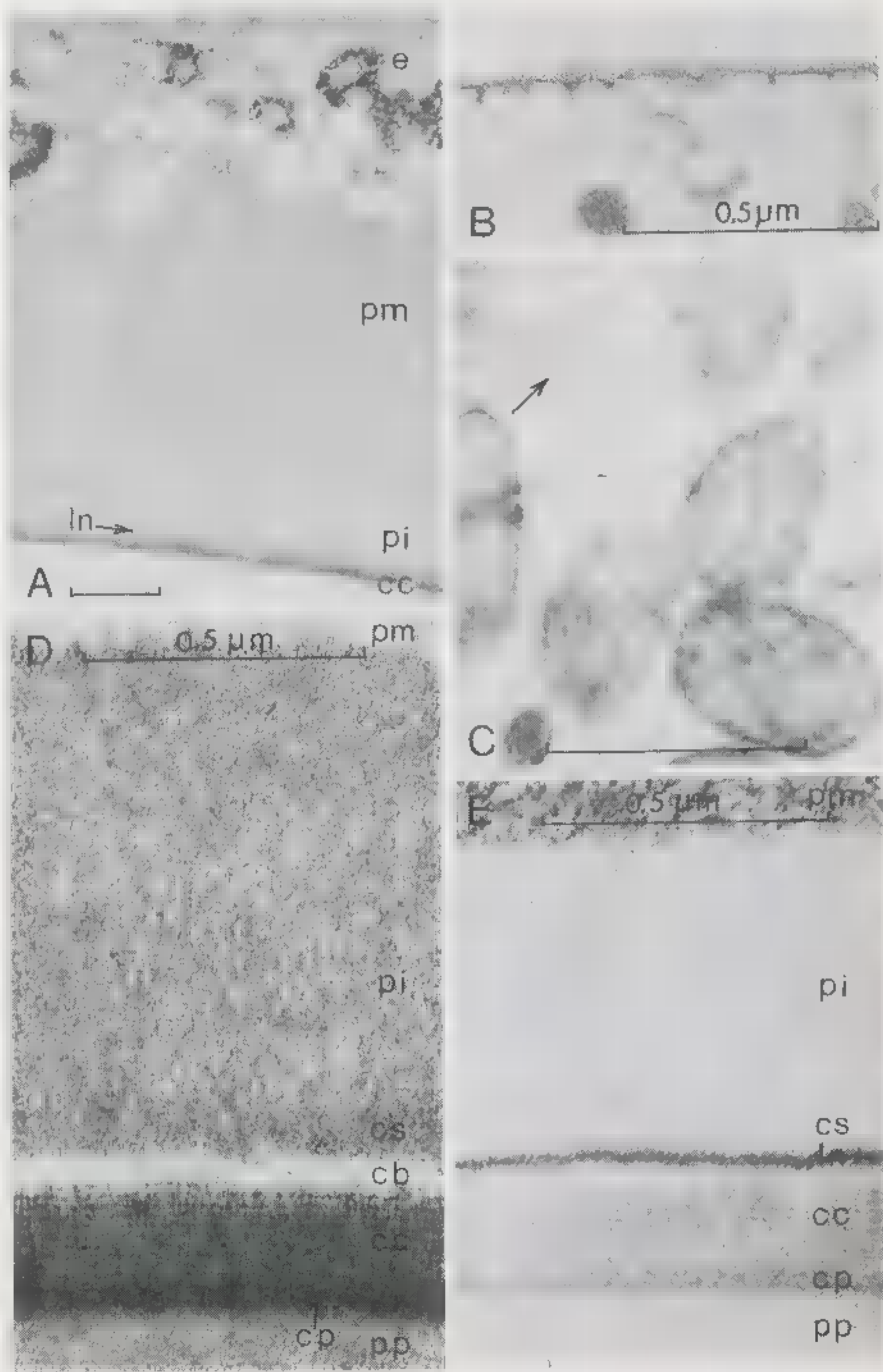

sg
r
le
pm
D


E
gl

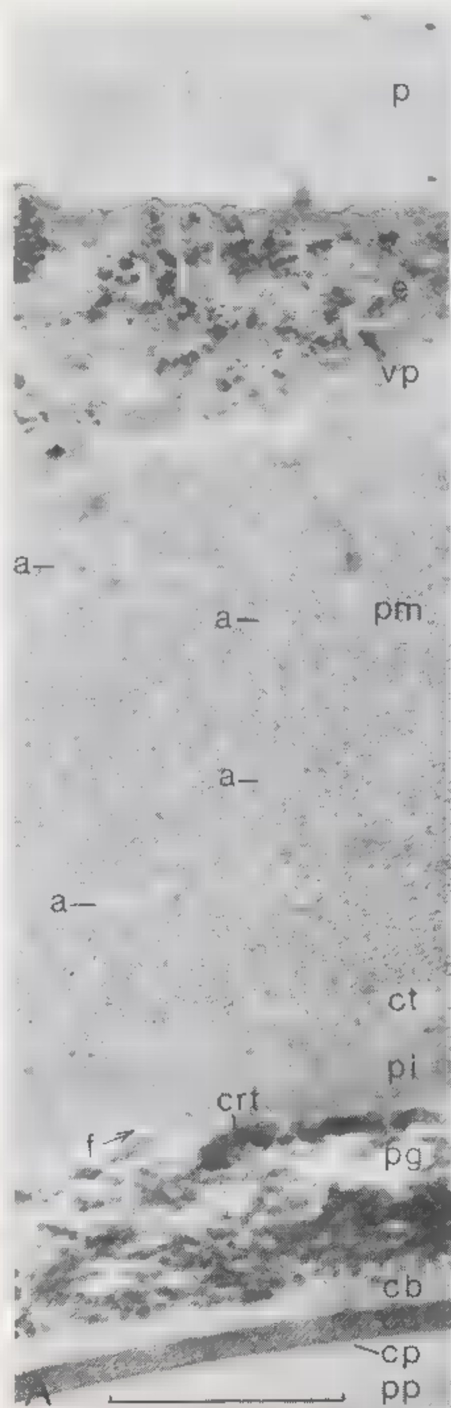

G
pv
s
0.5 µm

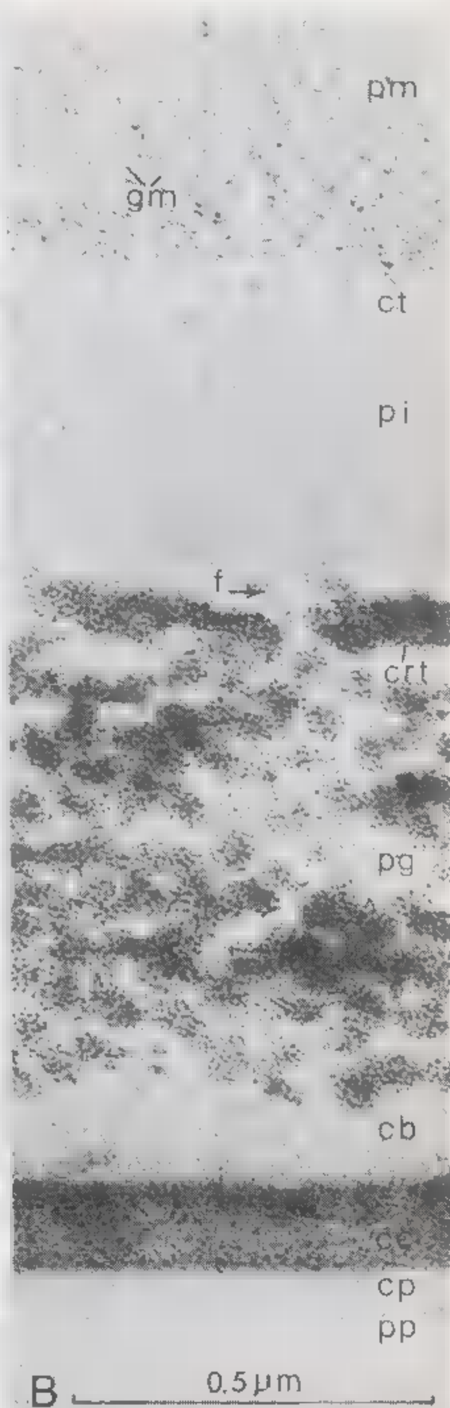

F

Pl. V

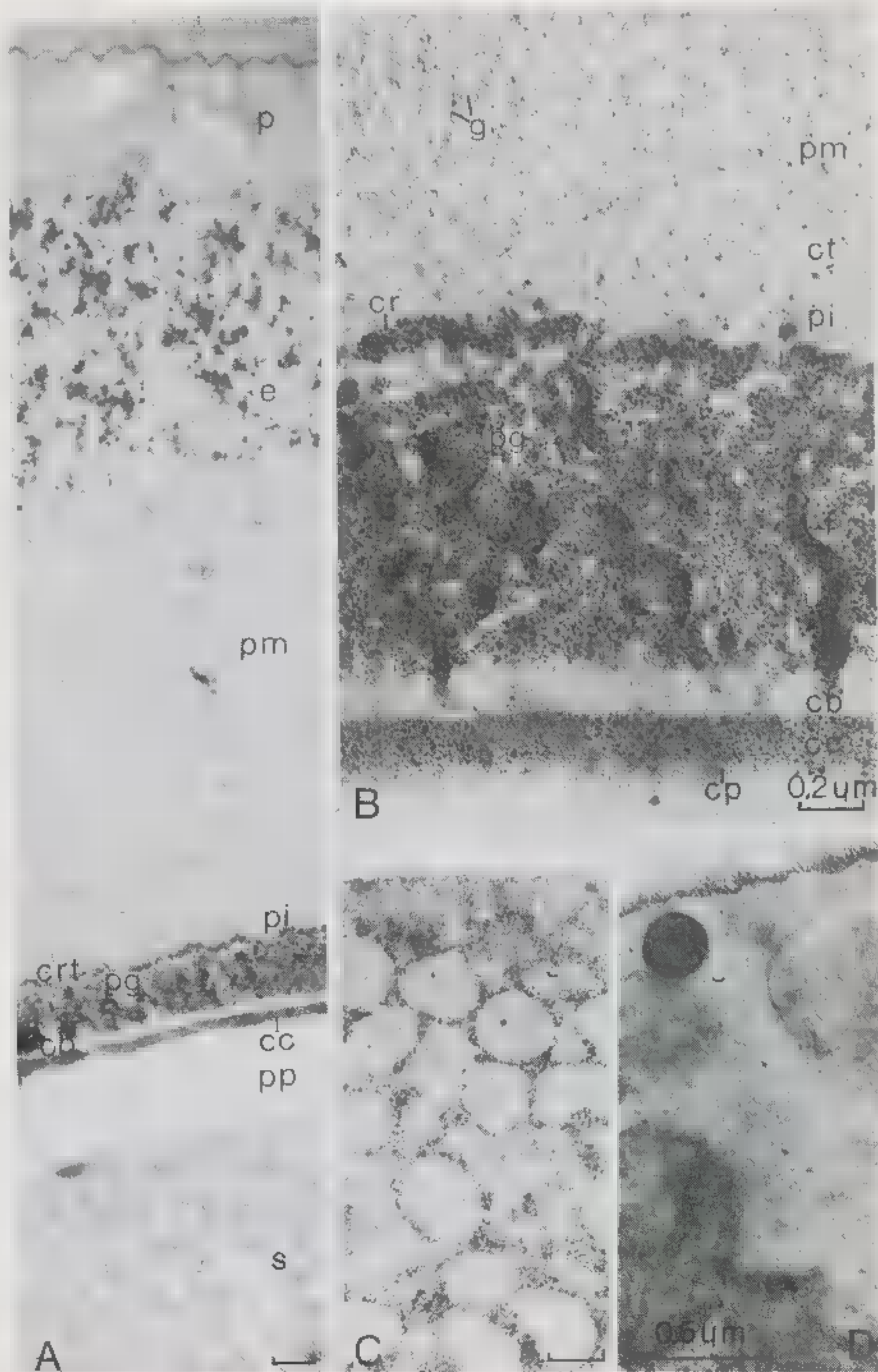

e
pm
ln
pi
A
cc
B
0,5µm
C
D
0,5 µm
pm
pi
cs
cb
cc
cp
pp
E
0,5 µm
pm
pi
cs
cc
cp
pp

Pl. VI

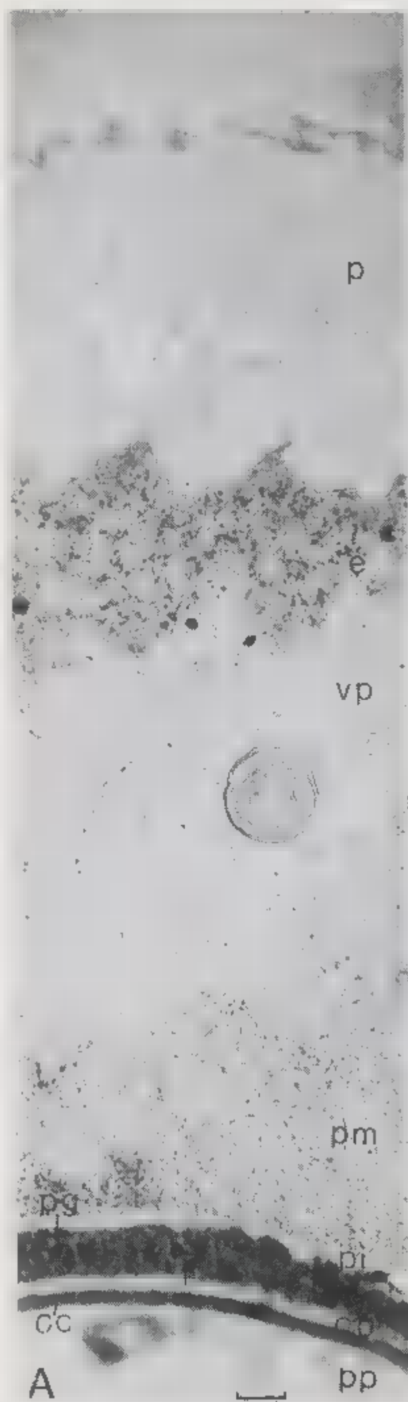

p
e
vp
a
pm
a
a
a
ct
pi
crt
f
pg
cb
cp
pp
A

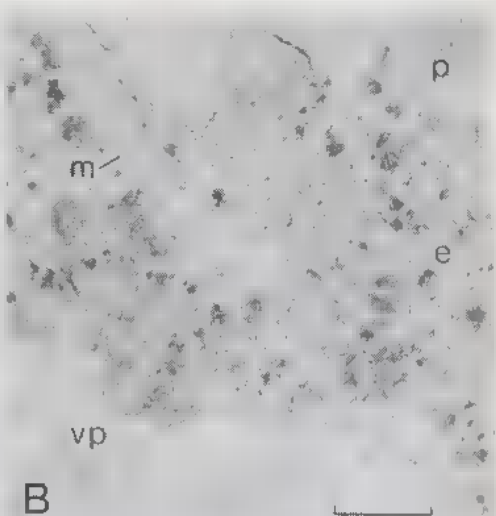

pm
gm
ct
pi
f
crt
pg
cb
ce
cp
pp
B
0,5 µm

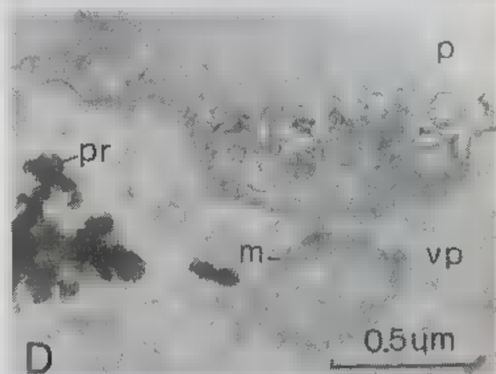
Pl. VII

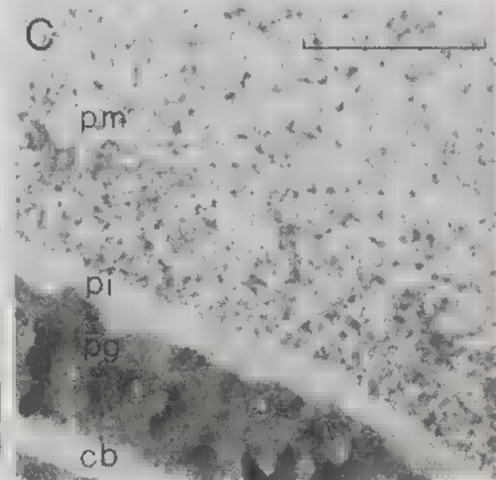


Pl. VIII

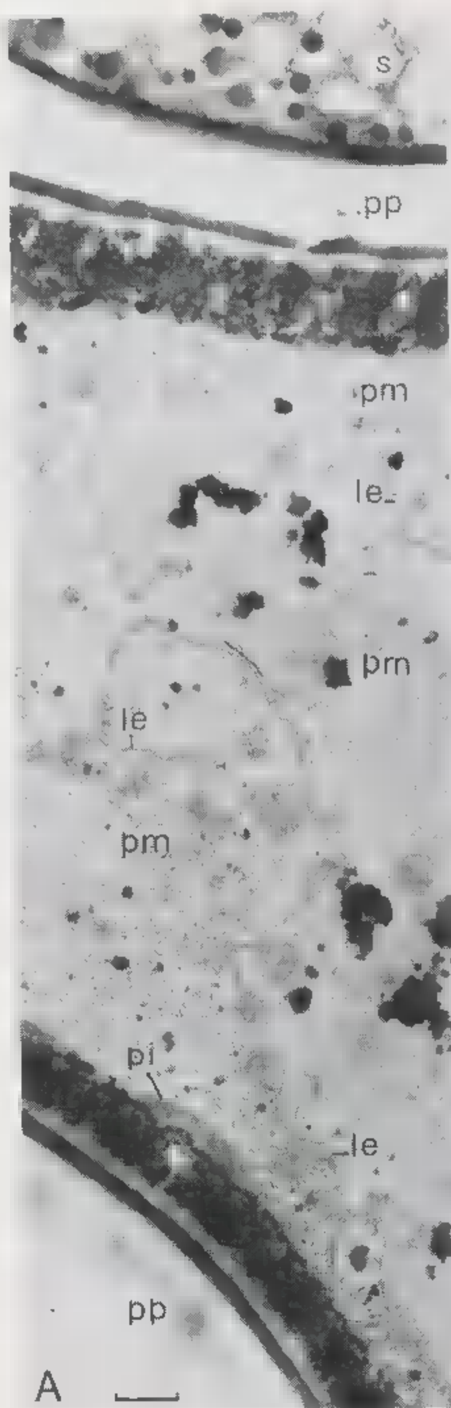


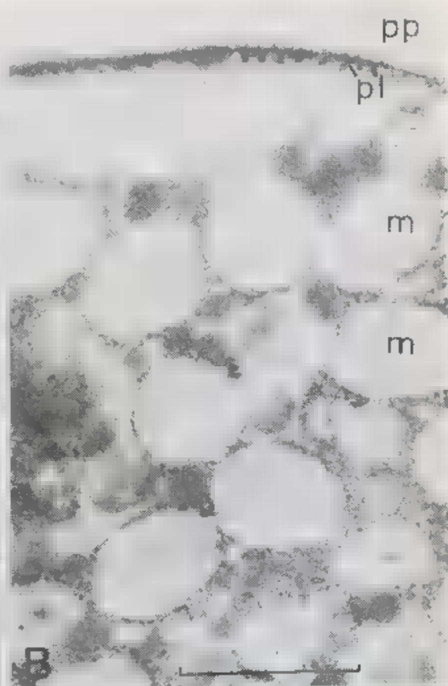


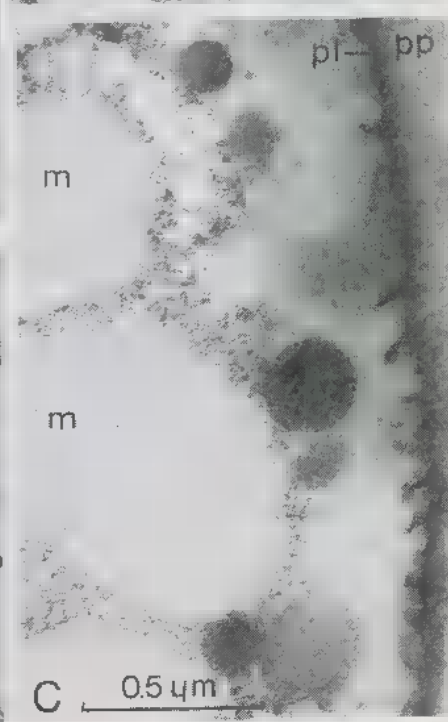




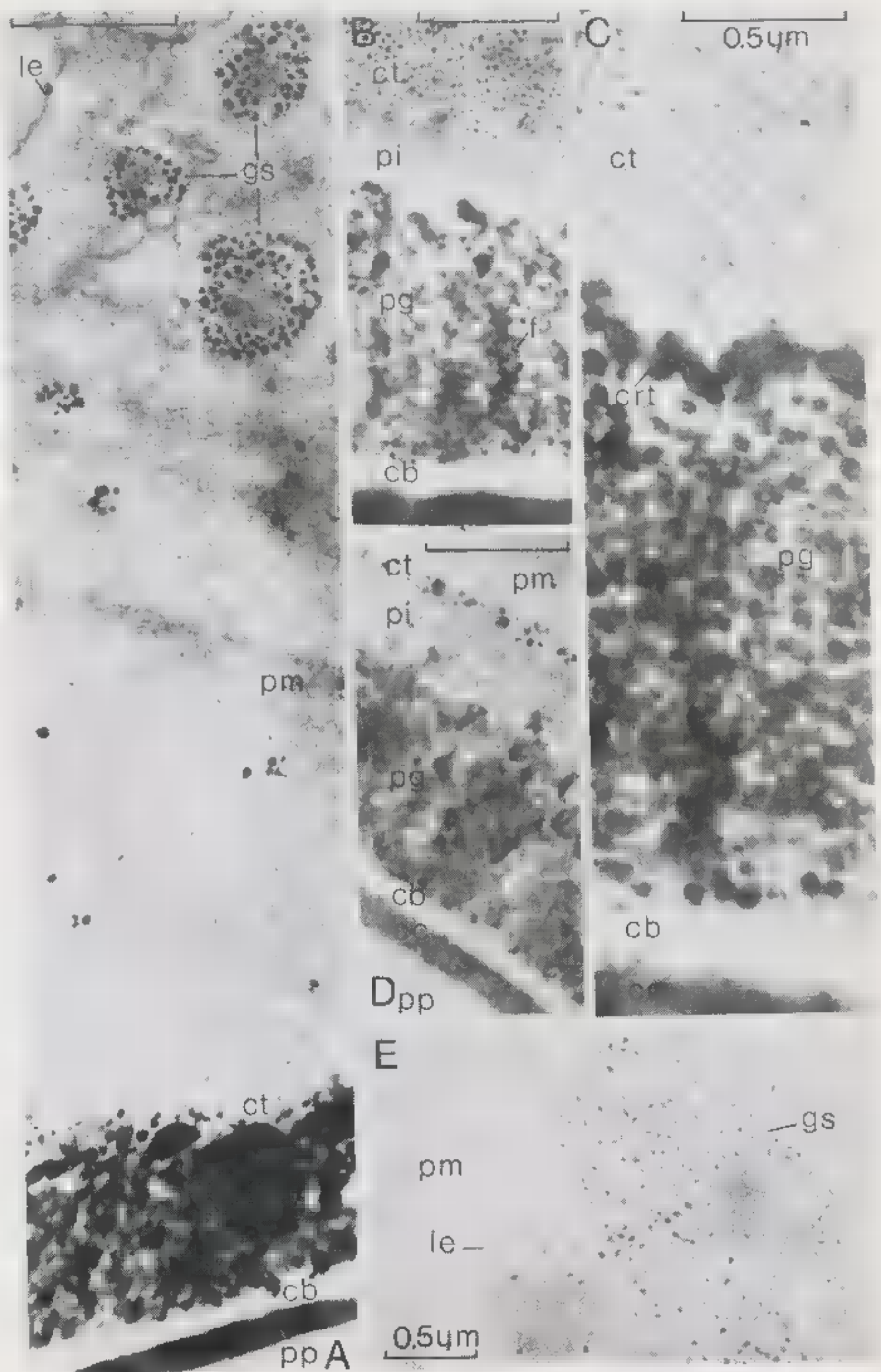
Pl. IX





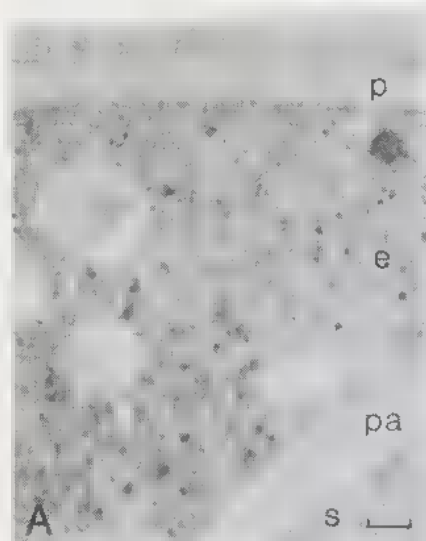


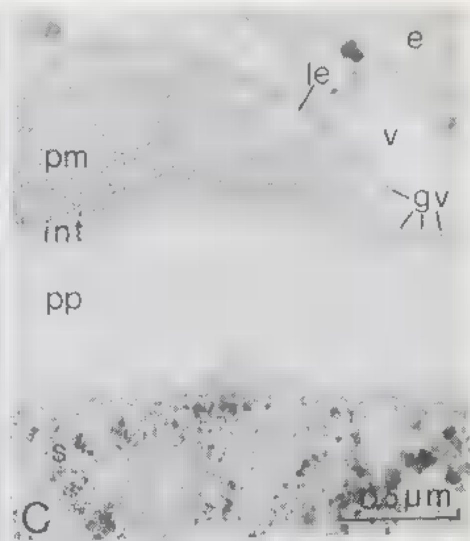
Pl. X

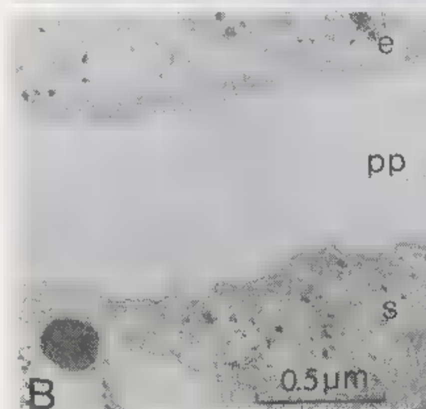


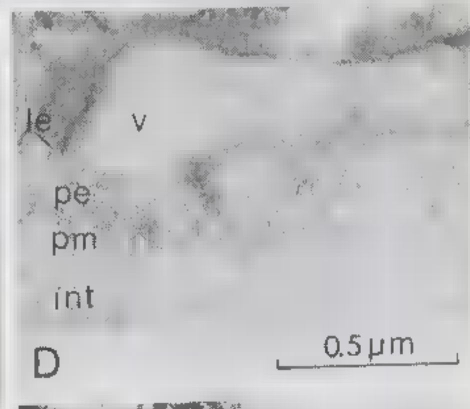
B
C
0.5µm
le
ct
gs
pi
ct
pg
f
crt
cb
ct
pm
pi
pg
pg
pm
cb
cb
Dpp
E
ct
gs
pm
le
cb
pp A
0.5µm

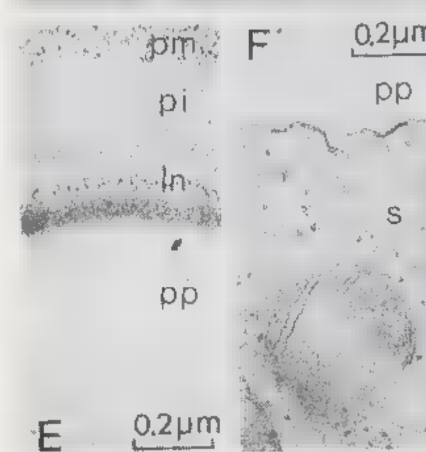
Pl. XI


p
e
pa
s
A

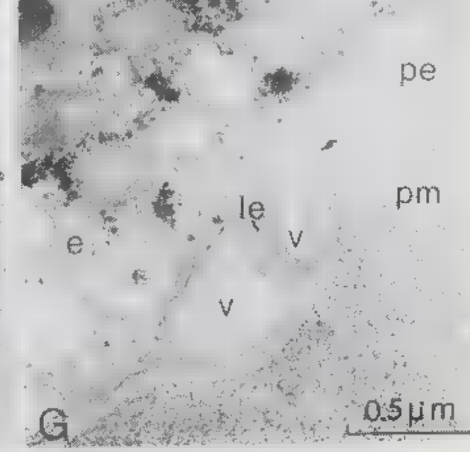

e
le
v
pm
gv
int
pp
s
C
0.5 µm


e
pp
s
B
0.5 µm

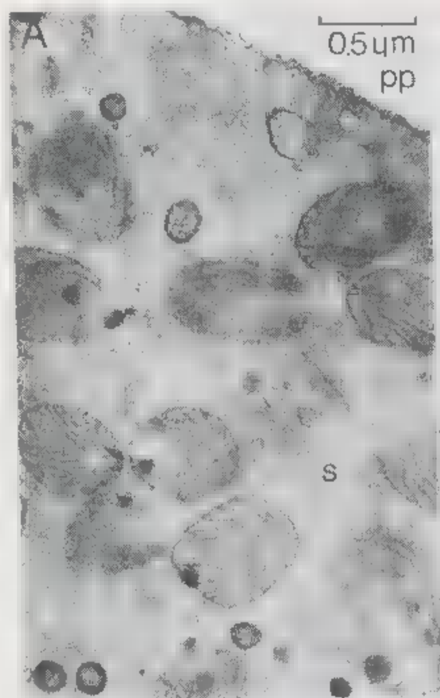

le
v
pe
pm
int
D
0.5 µm

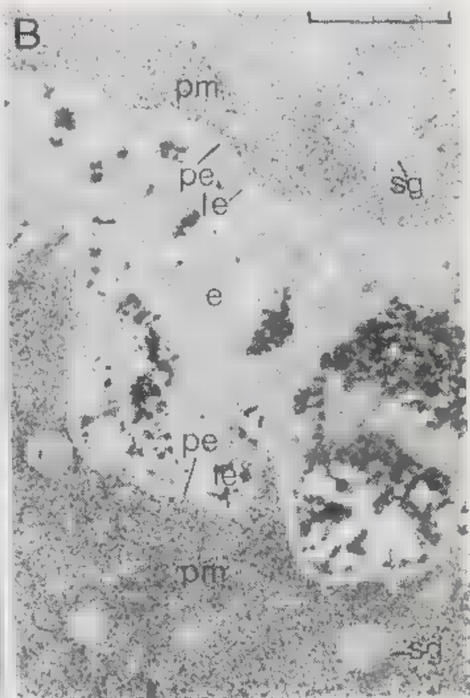

pm
pi
ln
pp
E
0.2 µm

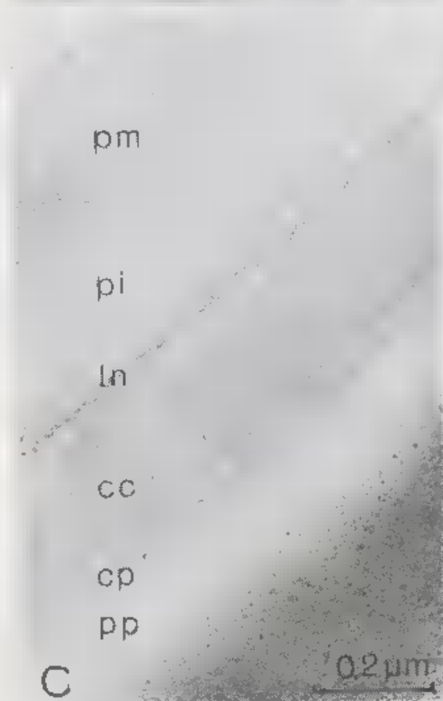

F
0.2 µm
pp
s

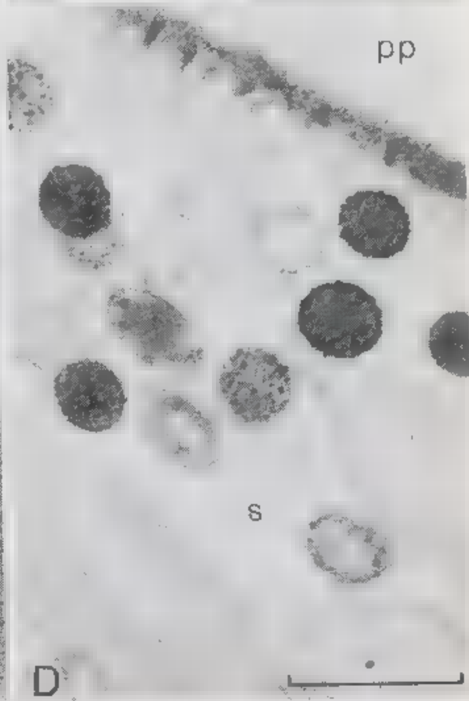

pe
pm
le
e
v
v
G
0.5 µm

Pl. XII

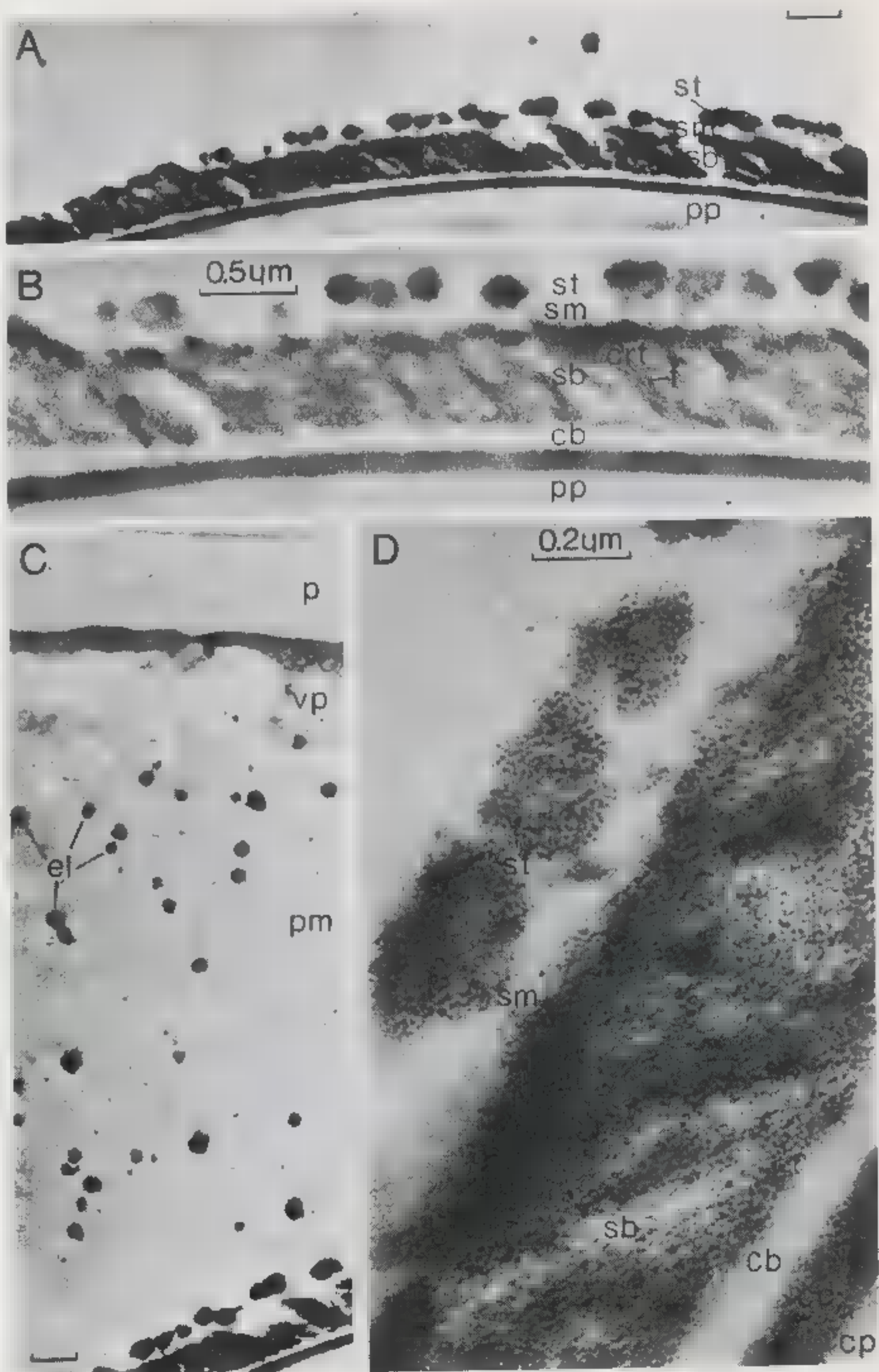




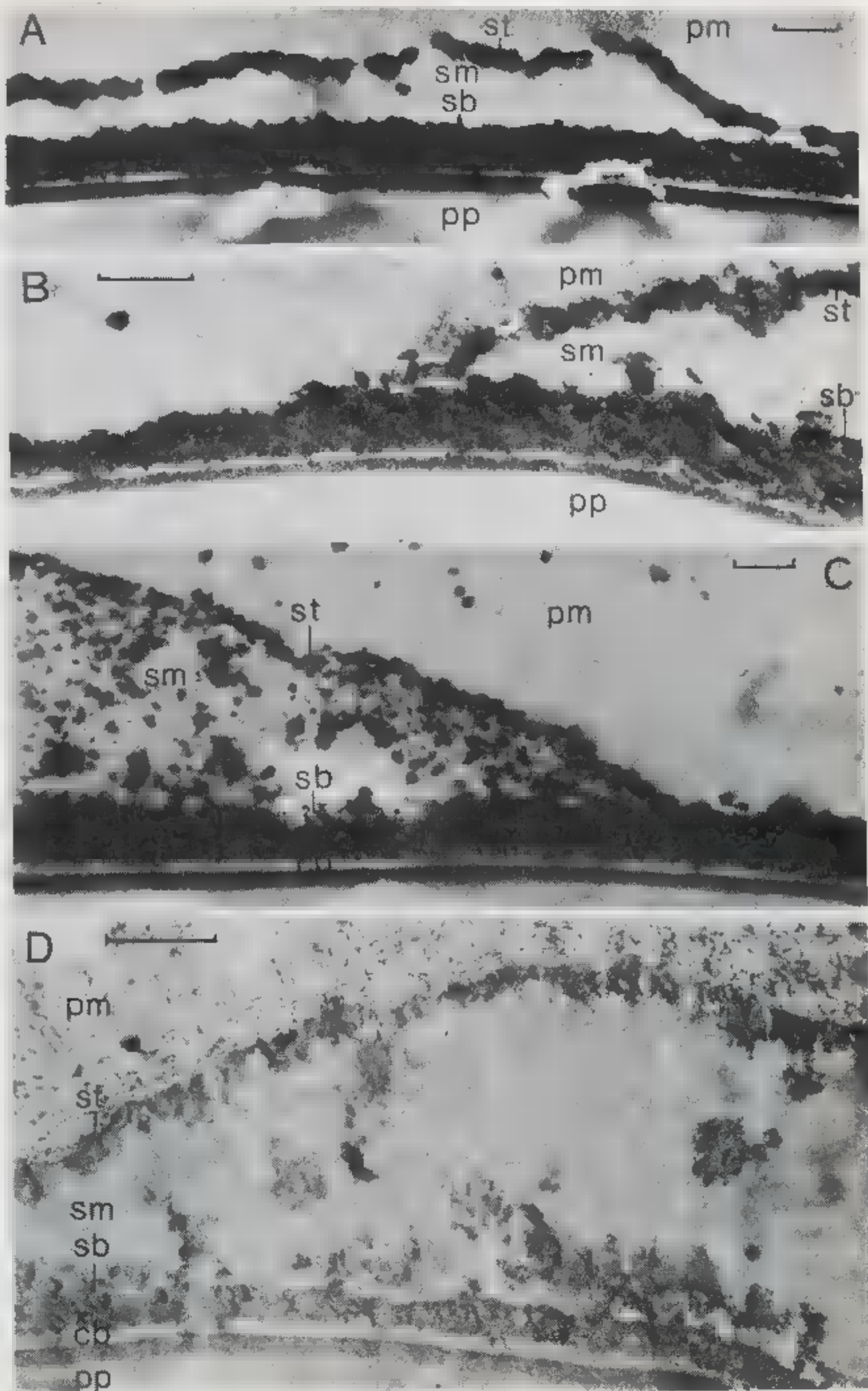




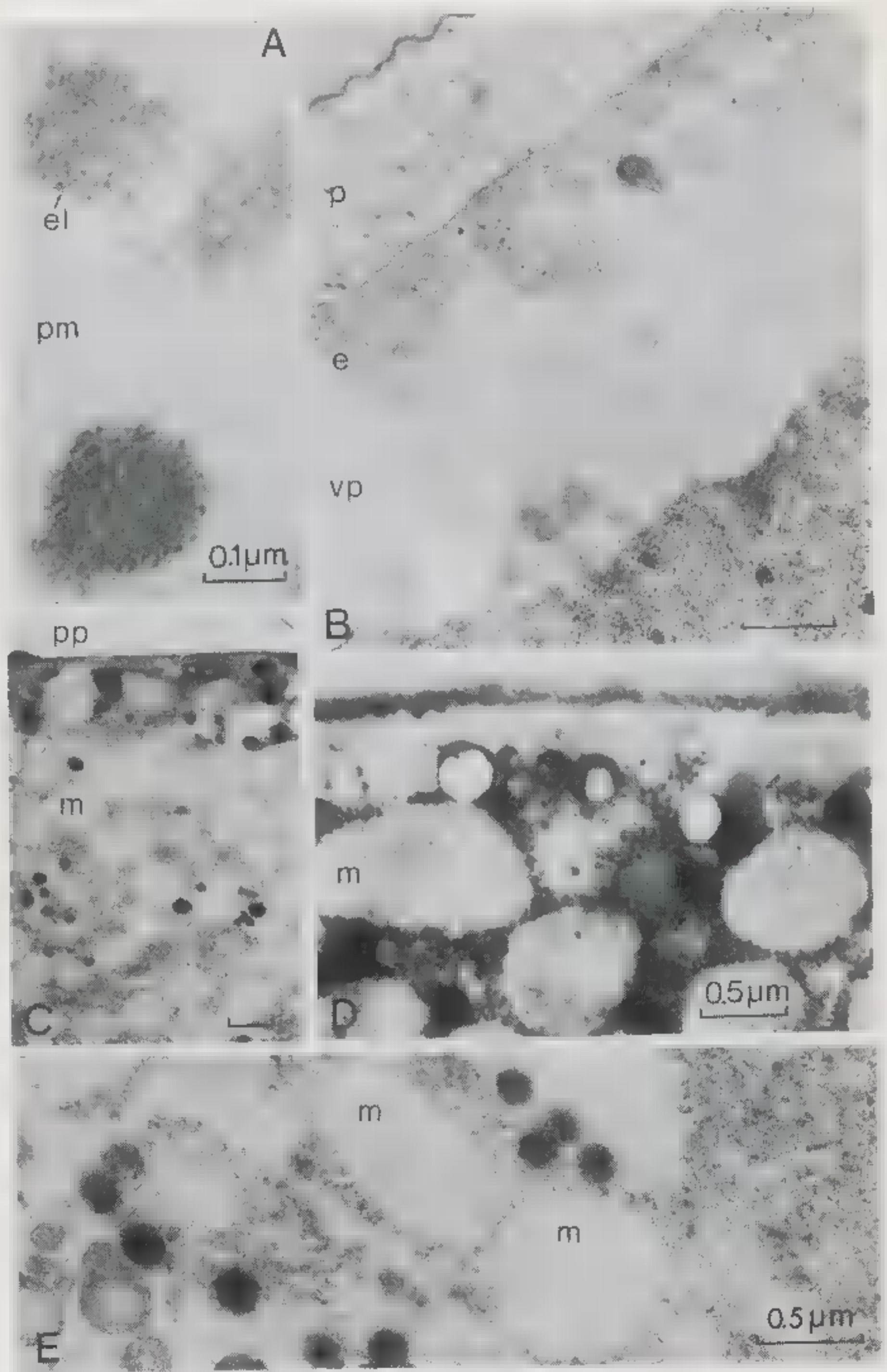
Pl. XIII


A
st
sm
sb
pp
B
0.5µm
st
sm
crt
sb
cb
pp
C
p
vp
el
pm
D
0.2µm
st
sm
sb
cb
cp

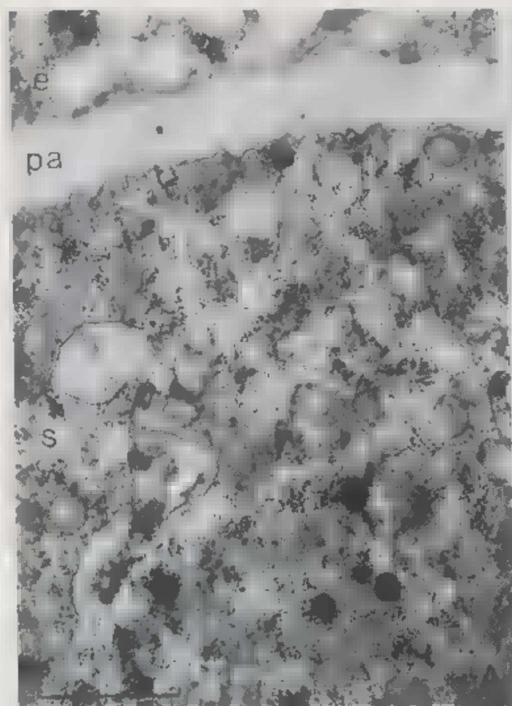
Pl. XIV

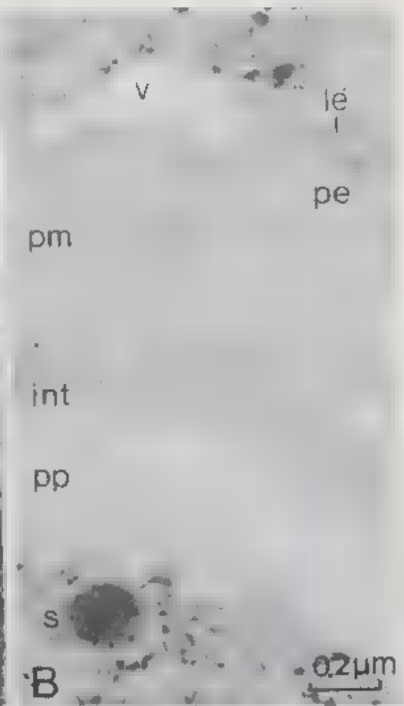


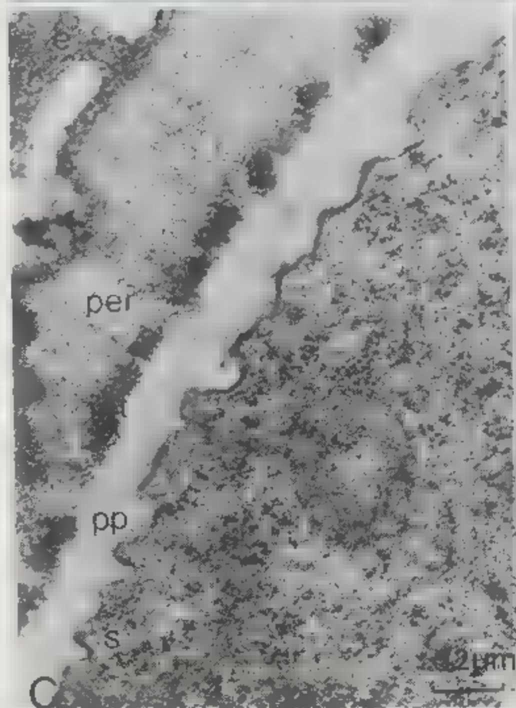
Pl. XV

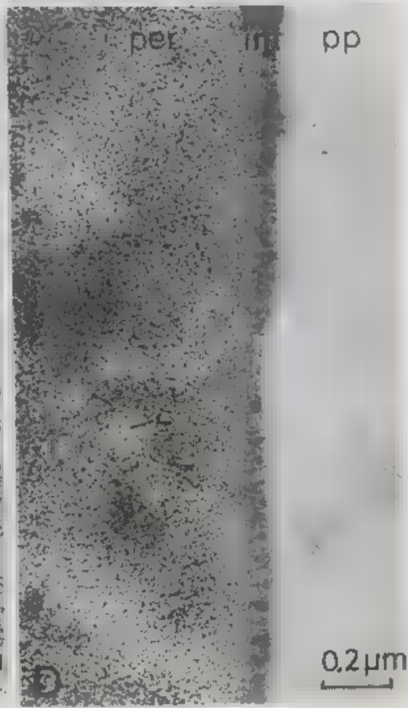


Pl. XVI

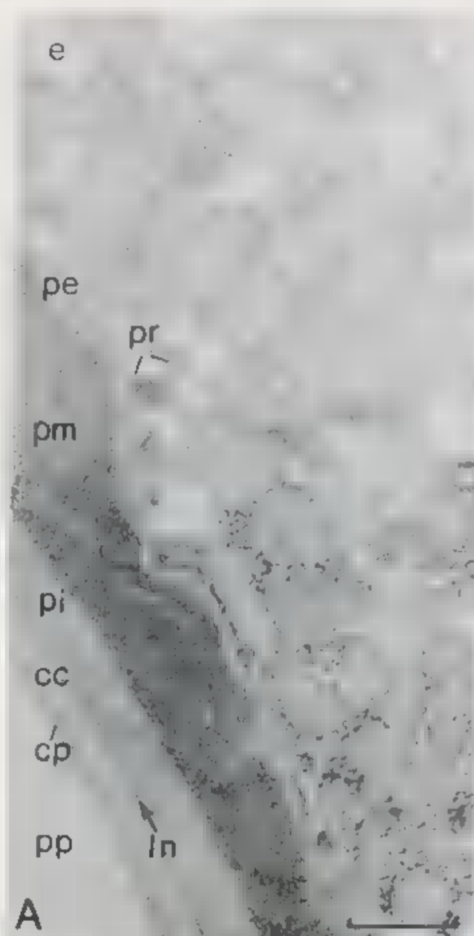


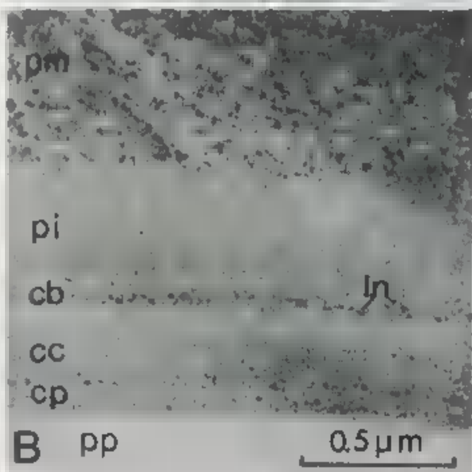




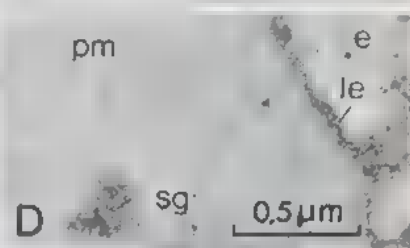


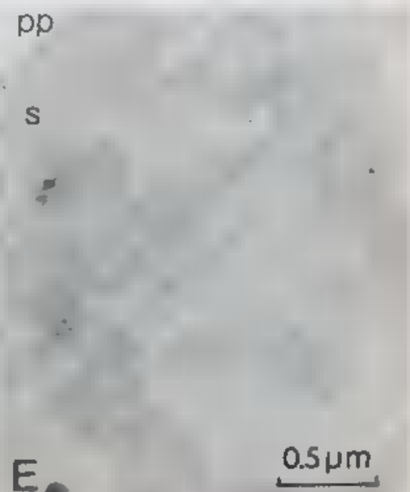
Pl. XVII


e
pe
pr
pm
pi
cc
cp
pp
ln
A

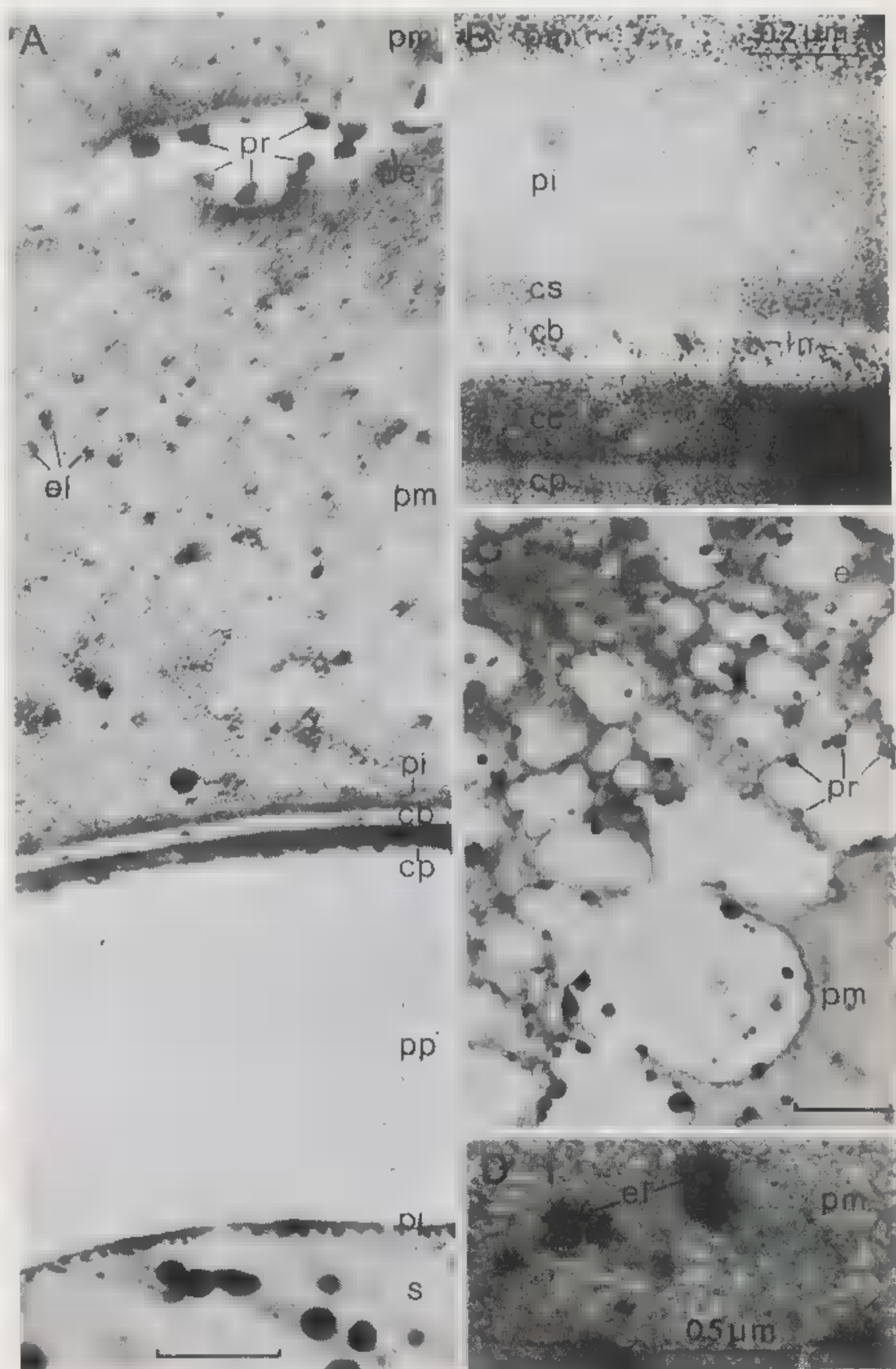

pm
pi
cb
ln
cc
cp
B
pp
0.5 µm


e
sg
pm
pi
ln
C
cc

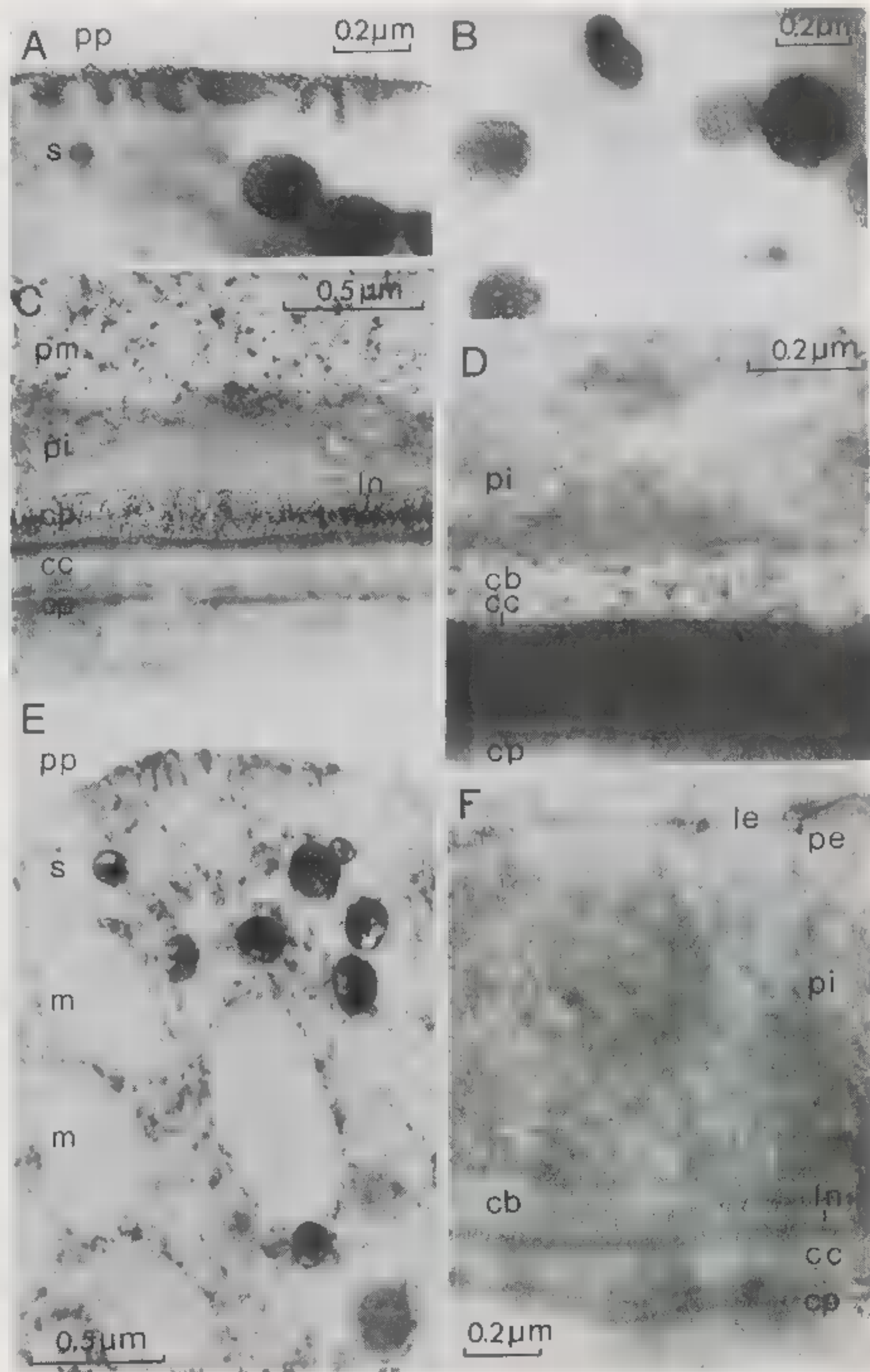

pm
e
le
sg
D
0.5 µm


pp
s
0.5 µm
E

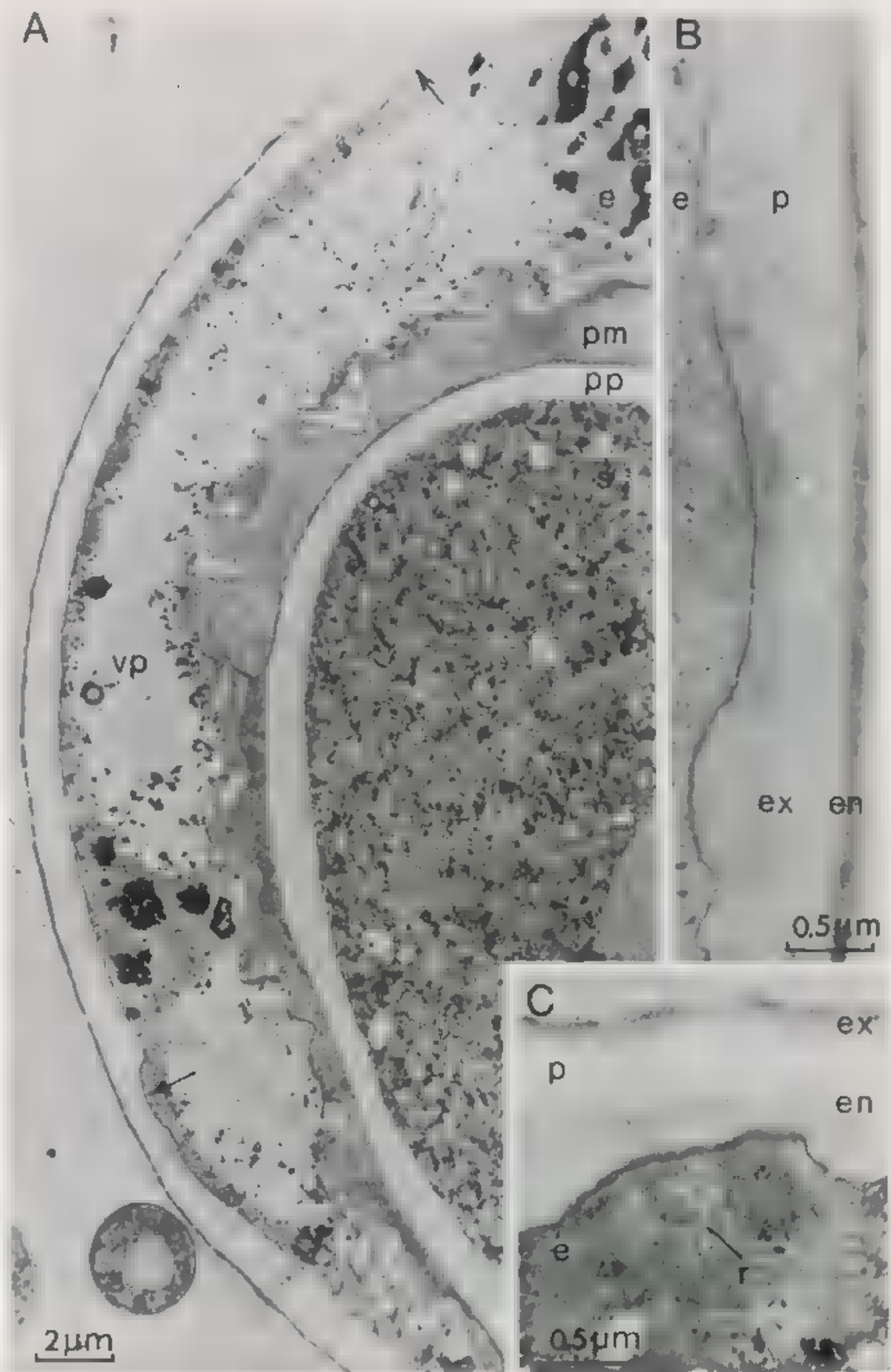
Pl. XVIII



Pl. XIX


A
pp
0.2µm
s
B
0.2µm
C
0.5µm
pm
pi
ln
cp
cc
D
0.2µm
pi
cb
cc
cp
E
pp
s
m
m
0.5µm
F
le
pe
pi
cb
ln
cc
cp
0.2µm

Pl. XX



Pl. XXI

ÉTUDE D'URÉDINÉES

par G. VIENNOT-BOURGIN*

RÉSUMÉ. — Deux Urédinées nouvelles sont décrites. La première est un *AEcidium* parasite du *Colchicum autumnale*. La seconde est *Puccinia ptychotidis* sur *Ptychotis heterophylla* qui appartient au groupe morphologique représenté par *P. oreoselini* (Strauss) Fck. sur de nombreuses Ombellifères.

ABSTRACT. — Two new species of *Pucciniaceae* discovered in south France are described : *AEcidium colchici-autumnalis* living on *Colchicum autumnale* and *Puccinia ptychotidis* on *Ptychotis heterophylla*.

Nous décrivons deux Urédinées, dont l'une doit être considérée comme inédite, qui font partie des nombreuses espèces de micromycètes parasites récoltées par Michel PONCHET dans les Alpes-maritimes au cours de ces dernières années.

I. — ***AEcidium*** sp., sur les limbes foliaires de *Colchicum autumnale* L., en zone humide près du village de Caussols, 15 mai 1978 (Fig. 1).

La plante phanérogame, de détermination douteuse à l'époque du prélèvement, a été identifiée par la suite lors de la floraison automnale de spécimens encore porteurs de conceptacles desséchés.

Le parasite comporte deux stades évolutifs. Ce sont d'abord des pycnides caractérisées sous la forme de petits bombements hémisphériques, rougeâtres ou ocre, épiphylles ou amphigènes. Apparaissent ensuite des conceptacles cupuliformes, devenant progressivement naviculaires, disposés en séries linéaires parallèles aux nervures, hypophylles, ou parfois distribués sur les deux faces du limbe sur des macules tissulaires orangées.

* Institut National Agronomique, Laboratoire de Pathologie Végétale, 16 rue Cl. Bernard, 75005 Paris.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptog., Mycol.)* TOME 2 (1981).

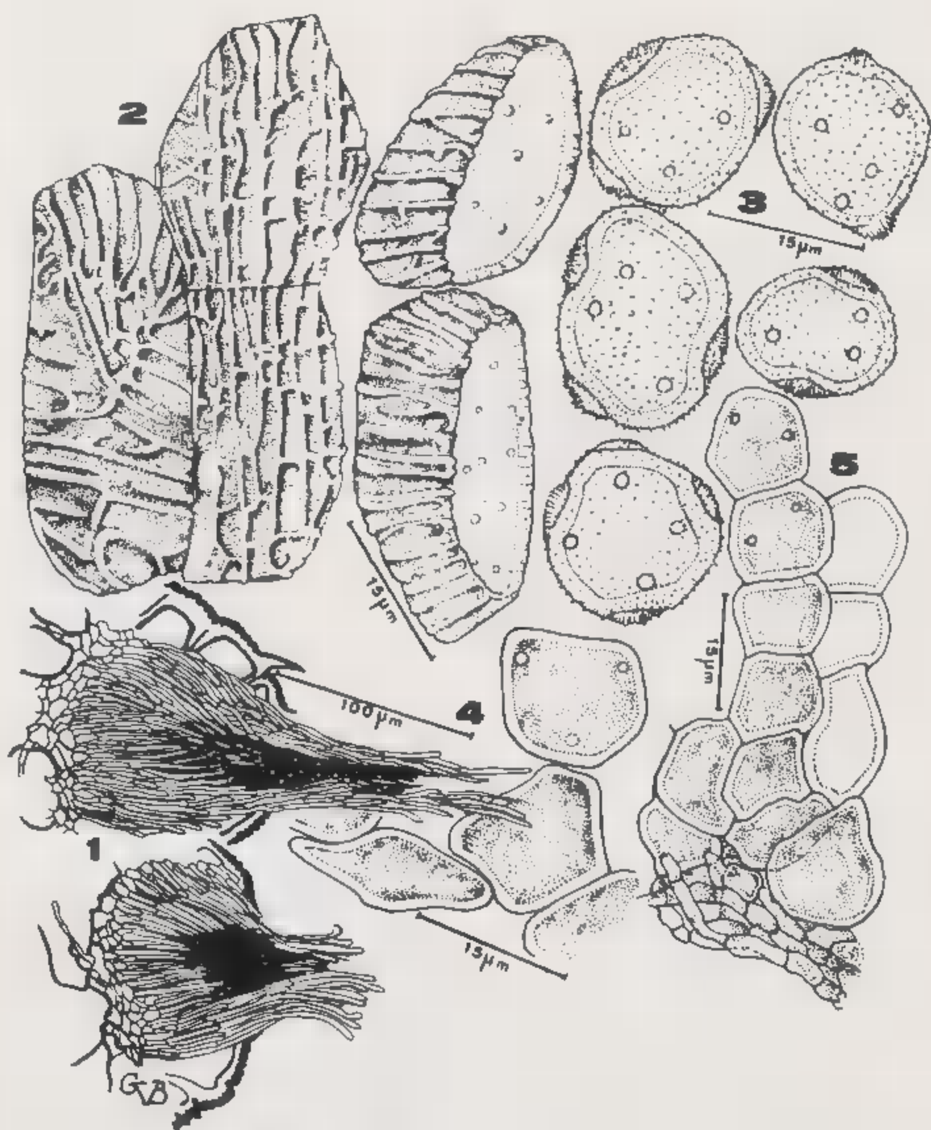


Fig. 1. — 1: Sections transversales dans une pycnide de l'*Æcidium colchici-autumnalis*. 2 : cellules pseudopéridiales. 3 : écidiospores. 4 : écidiospores immatures. 5 : assise génératrice des écidiospores et chaînette de spores.

Des coupes transversales de limbe foliaire, réalisées au microtome à congélation, permettent d'observer :

a - les pycnides. Elles occupent une position subépidermique. Globuleuses ou piriformes, amincies au niveau ostiolaire, elles mesurent 80 à 100µm dans leur plus grande largeur et 80 à 125µm en hauteur. L'ostiole est pourvu de périphyses réunies en un pinceau plus ou moins épanoui. Les pycniospores, sphériques ou faiblement ovoïdes, mesurent 3 à 5µm.

b - les conceptacles écidioïdes cupuliformes, profondément inclus dans les tissus de l'hôte, puis finalement déhiscents, largement ovalaires en section transversale, présentent une base large délimitée par un pseudoparenchyme dense. Chaque conceptacle atteint 800 à 900µm à sa base, sa profondeur variant de 250 à 400µm. On y distingue :

1) une assise génératrice des spores constituée de cellules prismatiques ou polyédriques.

2) une enveloppe pseudopéridiale différenciée à partir des cellules périphériques de l'assise génératrice. Elle figure une corbeille très régulière délimitant le sore. A sa base on observe des cellules tabulaires étroites, très régulièrement et fermement juxtaposées, à paroi uniformément mince (environ 2µm). Dans le tiers supérieur de l'enveloppe pseudopéridiale la conformation des cellules se modifie profondément mais de façon progressive. Ces cellules deviennent presque cubique-arrondies ce qui en facilite la désarticulation. Le caractère le plus apparent de ces cellules est la différenciation d'une paroi externe épaisse, atteignant 10µm, striée-canaliculée, tandis que la paroi interne est mince (2 à 4µm), lisse ou ornée de quelques verrues éparses.

Les cellules ultimes de la couche pseudopéridiale mesurent 20-37 x 15-23µm.

3) Les spores constituent d'abord des chaînes qui se dissocient précocement si bien que cette disposition devient difficilement perceptible dans un conceptacle parvenu à son complet développement.

Ce sont des cellules d'abord cubiques ou polyédriques à paroi lisse, puis devenant globuleuses ou ovoïdes et ornementées. La paroi en est alors fauve clair, épaisse de 2 à 2,5µm, uniformément couverte de verrues fines. Le contour de la spore apparaît anguleux par suite de la présence de 2 à 4 papilles convexes, crénelées, à base atteignant 6 à 7,5µm. En outre, une macération prolongée dans le lacto-phénol permet d'observer 3 à 4 pores germinatifs épars.

Ces spores mesurent 15-28 x 15-21µm (quelquefois jusqu'à 32µm en longueur).

c - le mycélium intercellulaire, très dense au niveau des conceptacles, est présent dans toute l'épaisseur du limbe et constitue ainsi une liaison très apparente entre les conceptacles cupuliformes et les pycnides. Ce sont des filaments fins, enchevêtrés ou disposés en faisceaux.

Afin de définir la nature des conceptacles formés dans les feuilles du *Colchicum autumnale*, nous rappellerons tout d'abord qu'il existe des Urédinées à cycle complet admettant 5 types de spores et des espèces à cycle incomplet pour lesquelles un ou plusieurs appareils sporifères font défaut.

Les Urédinées à cycle complet, ou eu-cycliques, selon la classification de SCHROETER (1879) amendée par ARTHUR (1929) puis par LAUNDON

(1965), homothalliques ou hétérothalliques, se développent tantôt sur une seule plante (espèce autoxène), tantôt sur deux plantes-hôtes différentes (espèce hétéroxène) en produisant la multiplicité des formes évolutives décrites chez les Urédinées. Ces formes diffèrent entre elles par leur morphologie, leur cytologie, leur fonction cyclique et aussi leur capacité de sporulation. Il est généralement admis qu'à partir d'une spore contaminatrice, qui est la basidiospore issue de la germination du kyste basidiogène ou téleutospore, apparaissent successivement des pycnides sur le thalle haploïde, puis après la réalisation du dicaryon, des écidiospores et des urédospores. Toutes ces spores ont essentiellement une fonction disséminatrice, la production des téleutospores achevant le cycle.

Les pycniospores et les écidiospores sont encore présentes chez les Urédinées à cycle incomplet, telles que les opsis-cycliques, où le stade urédospore fait défaut. Par contre pour les brachy-cycliques, si des pycnides se constituent fréquemment, ce sont les écidiospores qui ne se forment pas tandis que des urédospores sont produites avant que n'apparaissent les téleutospores. En considérant ces deux groupes on admet qu'à partir du mycélium (et par suite d'une fusion entre hyphes haploïdes), il peut se former soit des écidiospores, soit des urédospores.

Cette contraction cyclique devient très apparente si l'on considère les espèces micro-cycliques et lepto-cycliques où le stade téleutospore est seulement précédé de la formation de pycnides alors que des écidiospores et des urédospores ne se constituent pas.

Par ailleurs l'absence de production de téleutospores marque le terme final de la dégradation cyclique de certaines Urédinées. C'est le cas des espèces reléguées dans les genres *Æcidium (sensu lato)* ou *Uredo*. De ce fait la définition de la pycniospore en tant qu'organe fécondateur peut être remise en question. L'existence de deux noyaux dans les pycniospores, reconnue pour 26 espèces d'Urédinées autoxènes eu-cycliques, opsis-cycliques ou brachy-cycliques provenant d'Europe ou des régions intertropicales, selon les observations rapportées en particulier par Mc GINNIS (1960), P. HEIM (1964) et plus récemment par SLEIMAN (1972), peut être interprétée de deux façons :

a - la formation pycnidienne, chez certaines Urédinées, correspondrait à une concentration mycélienne dicaryotique, ce qui exclut le rôle sexuel attribué de façon courante à la pycniospore; celle-ci n'ayant alors, chez les espèces micro et lepto-cycliques, qu'un rôle de dispersion ou tout au moins d'agent de contamination de proche en proche.

b - on peut aussi envisager que la nature binucléée des sporophores et des pycniospores correspond à une mitose supplémentaire. Il faudrait alors admettre, pour attribuer à ces spores un rôle sexuel, qu'un noyau dégénère avant la formation du dicaryon. Cette hypothèse n'a cependant jamais encore été démontrée.

Ainsi, l'apparition du dicaryon, chez certaines Urédinées incomplètes cycliquement, précèderait la formation des pycnides, celle-ci pouvant être fortuite.

Cette conception se trouve fortifiée par la coexistence souvent très intime entre ces conceptacles et les écidies, les urédospores et même les sores à téleutospores.

Enfin, il convient d'infléchir l'affirmation selon laquelle l'écidiospore est inapte à reproduire l'écidie, mais par contre, initie l'urédospore ou la téleutospore. En effet, nous avons obtenu (VIENNOT-BOURGIN, 1964, 1966) le renouvellement de l'*AEcidium tubiflorae* P. Henn., espèce africaine, qui s'est multiplié pendant deux années consécutives sur l'*Elytraria squamosa* Lind. cultivé en serre. De même nous avons démontré que les écidiospores du *Puccinia lagenophorae* Cke., qui est une espèce dépourvue de pycnides hébergée par des *Senecio*, sont capables de réinfecter cette plante et de reproduire des écidies. Ce fait confirme les résultats expérimentaux de WALSHAM et WILSON (1964) sur *Calendula officinalis* L., *Bellis perennis* L. et *Senecio cruentus* DC.

En tenant compte de ces résultats, on doit admettre que la nature, la position et la conformation des conceptacles observés sur le *Colchicum autumnale* correspondent à celles d'un stade écidien. En effet :

1) de nombreuses pycnides et des conceptacles cupuliformes se constituent aux mêmes emplacements sur les limbes foliaires. La coexistence et la dépendance de ces deux types d'appareils sporifères est confirmée par leur rattachement à un mycélium dense, développé dans toute l'épaisseur du limbe foliaire.

2) les conceptacles cupuliformes sont du type *AEcidium*, le sore étant limité par une assise pseudo-péridiale bien caractérisée se développant et se différenciant continûment; les spores (écidiospores) naissant à partir de sporophores prismatiques juxtaposés en une assise uniforme.

Sur le *Colchicum autumnale*, GUYOT et MASSENOT (1958) ont décrit un *Uredo colchici* sp. nov. récolté à la lisière marécageuse de la forêt de la Sainte-Baume (Var), c'est-à-dire dans une localité comparable et proche du plateau de Caussols. Selon le dernier auteur que nous avons consulté, le spécimen type aurait été déposé dans les herbiers mycologiques du Museum National d'Histoire Naturelle. Malheureusement il n'y figure pas.

Cependant la plupart des caractéristiques produites dans la diagnose permettent de considérer qu'il s'agit dans les deux cas de la même espèce. Le faible développement du parasite sur le spécimen étudié par GUYOT et MASSENOT n'a cependant pas permis à ces auteurs de préciser la structure et l'importance du pseudopéridium et les caractéristiques des cellules de cette enveloppe et de la sporée.

En conclusion, nous proposons de rapporter cette Urédinée au genre *AEcidium* en le désignant *AE. colchici-autumnalis* (Guyot et Massenot) Viennot-Bourgin sp. nov. avec la diagnose suivante :

Pycnidiis epiphyllis vel amphigenis, sparsis vel aggregatis, melleis, globosis vel piriformis, 80-100µm latis, 80-125µm altis, in maculis pallide ochraceis usque ad 3-8mm diam. Pycniosporis ovoideis, 3-5µm diam.

Aecidiis hypophyllis, sparsis vel concentrice aggregatis, cupulatis, 800-1000µm

diam. Cellulis peridii cuboideis, hyalinis, firme conjunctis, 30-37 x 15-23µm, in series regularis dispositis; pariete interiore leve vel sparsis verruculosis, 2-4µm; pariete interiore usque 10µm crassa; striataque vel reticulate. Æcidiosporis cuboideis vel subglobosis, 15-28 x 15-21µm; episporio flavido vel brunneolo, 2-2,5µm crasso, subtiliter denseque verruculoso; 2-4 papillae praeditis, 3-4 poris germinativis distincte pertuso.

Hab. in foliis Colchici autumnalis, Caussols (Alpes-maritimes), *Gallia meridionalis*, mai 1978.

II. — ***Puccinia ptychotidis*** Vienn.-Bourg. et Ponchet sp. nov. sur les feuilles et les tiges de *Ptychotis heterophylla* Koch, (Ombellifères) environs de Saint-Etienne de Tinée (Alpes-maritimes), août 1980[1].

Cette espèce appartient au groupe morphologique : *P. oreoselini* (Strauss) Fck. qui, sur les Ombellifères, réunit des espèces autoxènes caractérisées par des sores à téleutospores punctiformes, pulvérulents, renfermant des spores à



Fig. 2. Urédospores et téleutospores du *Puccinia psychotidis*.

1. La plante-hôte a été obligeamment déterminée par P. JOVET, Directeur du Centre national de floristique au Muséum national d'Histoire naturelle. Nous le remercions très vivement.

paroi réticulée, portées par un pédicelle fragile. Dans ce groupe, GAUMAN (1959) considère des espèces à développement macrocyclique, ou brachy-cyclique.

L'examen du matériel récolté par PONCHET ne permet d'observer que des urédospores et des téleutospores. L'espèce décrite ici est donc, provisoirement tout au moins, placée parmi les brachy-cycliques.

Les caractéristiques morphologiques sont les suivantes :

- sores urédosporifères punctiformes, largement dispersés ou groupés en amas sur les divisions foliaires, brun-roux vif, pulvérulents.
- urédospores globuleuses ou ellipsoïdes, 22-28 x 20-25µm (moyennes : 26,5 x 23,6), à paroi fauve clair, régulièrement épaisse de 2,5µm, finement couverte d'aiguillons hyalins. 2 pores germinatifs équatoriaux proéminents.
- sores téleutosporifères de même disposition, châtain foncé.
- téleutospores largement ellipsoïdes, à apex arrondi, atténuées au niveau de la cloison médiane, base arrondie un peu rétrécie, 32-48 x 20-23µm (moyennes : 38 x 22), à paroi fauve régulièrement épaisse de 2,5µm, couverte de verrues hémisphériques, de 1,5 à 2µm à leur base, éparses, ou, le plus souvent disposées en séries linéaires discontinues. Pore germinatif supérieur étroit, sans papille, en position apicale; pore germinatif inférieur près de l'insertion du pédicelle. Pédicelle hyalin, le plus souvent tronqué.

Ce *Puccinia* présente certains caractères communs avec le *P. rugulosa* Tranzsch. connu en Europe et en Asie sur différents *Peucedanum*, en particulier en ce qui concerne la nature de la verrucosité de la paroi des téleutospores. La distinction essentielle entre ces deux *Puccinia*, indépendamment des données biométriques, réside dans le fait que les urédospores du *P. rugulosa* présentent un épaississement marqué à l'apex (jusqu'à 6,5µm) et 3 ou 4 pores équatoriaux. Le *P. Terrieri* Gäumann, qui est hébergé par *Tommasinia altissima* Thell., est du même groupe morphologique, il présente également des urédospores à paroi épaissie apicalement.

La diagnose latine est la suivante :

Puccinia ptychotidis Vienn.-Bourg. et Ponchet sp. nov.

- *Soris uredosporiferis hypophyllis vel caulicolis, sparsis, minutis, mox nudis, pulverulentibus, cinnamomeis.*
- *Uredosporis globosis, vel ellipsoideis, 22-28 x 20-25µm, med. 26,5 x 23,6, membrana dilute brunnea, 2,5µm crassa, dense echinulate, poris germinatibus binis equatorialibus dispositis.*
- *Soris teleutosporiferis conformibus, atro-brunneis vel nigris.*
- *Teleutosporis late ellipsoideis, castaneo-brunneo, apice rotundatis vel leniter attenuatis, 30-48 x 20-23µm, med. 38-22; membrana 2,5µm, dispersus verruculoso, vel linearibus dispositis; poro germinativo cellulae superioris apicali, cellulae inferioris proxime pedicello plerumque sito; pedicello hyalino.*

Hab. in foliis caulibusque Ptychotis heterophylla, prope Saint-Etienne de Tinée, *Alpinus meridionalis.*

Les spécimens-type de l'*AEcidium colchici-autumnalis* et du *Puccinia ptychotidis* sont déposés dans les herbiers de Cryptogamie du Museum national d'Histoire naturelle.

BIBLIOGRAPHIE

ARTHUR J.C., 1929 — The plant rusts (Uredinales). Edit. John Willey and Sons, New York, 446 p.

GAUMANN E., 1959 — Die Rostpilze Mitteleuropas. Edit. Büchler et Cie, 1407 p.

GUYOT A.L. et MASSENOT M., 1958 — Contribution à l'étude des Urédinées du Sud-Est de la France. *Uredineana* V : 461-505.

HEIM P., 1964 — Le noyau chez les Urédinées. *Rev. de Mycol.* 29 : 9-65.

LAUNDON G.F., 1965 — The generic names of Uredinales. *Mycol. Pap.* 99, 24 p.

Mc GINNIS R.C., 1960 — Note on the occurrence of binucleate pycniospores in species of *Puccinia. Canad. J. Pl. Sci.* 40, 202.

SCHROETER, J., 1879 — Entwicklungsgeschichte einiger Rostpilze, II, III. *Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen.* Bd, III, heft 1, 51-93.

SLEIMAN F.T., 1972 — Biologie et Cytologie de quelques espèces de *Puccinia* parasites des Composées. Thèse. Paris VI.

VIENNOT-BOURGIN G., 1964 — La rouille australienne du Séneçon. *Rev. de Mycol.* 29 : 241-258.

VIENNOT-BOURGIN G., 1966 — Le renouvellement du stade écidien des Urédinales. *Rev. roum. Biol.* Botanique, II : 257-261.

WALSHAM D.F. et WILSON Irène M., 1964 — New groundsel rust in Europe. Internat. Botan. Congress, Edinburgh.

WILSON Irène et WALSHAM D.F., 1963 — A new disease of groundsel, *Nature*, 494, 383.

ANALYSES BIBLIOGRAPHIQUES

JULICH W. et STALPERS J.A., 1980 — The resupinate non-poroid Aphyllophorales of the temperate northern hemisphere. North-Holland Publish. Comp. Amsterdam, 335 p., 6 pl., 1 sch.

Les mycologues désireux d'identifier leurs récoltes d'Aphyllophorales ont pendant longtemps déploré de n'avoir à leur disposition pour de telles investigations que bien peu d'ouvrages descriptifs d'importance générale. Il en est tout autrement à présent car, depuis quelques années, un certain nombre de flores relatives à cet ensemble de champignons si vaste et si diversifié, a vu le jour. Parmi les plus récemment publiés, celle que nous devons à W. JULICH et J.A. STALPERS se rapporte uniquement, comme l'explicite parfaitement le titre, aux Aphyllophorales dont le chapeau est plus ou moins entièrement adhérent au support, avec une surface hyméniale lisse, tuberculeuse ou dentée; d'autre part, seules sont traitées les espèces rencontrées dans la zone tempérée de l'hémisphère nord.

Ainsi nettement délimité dans son objet, cet ouvrage où s'affirme de la part des auteurs une indéniable volonté de concision, se révèle méthodiquement construit. A la brève introduction qui apporte les explications nécessaires à la bonne utilisation de la partie descriptive, succède un glossaire détaillé accompagné de dessins au trait. Les définitions des termes s'appliquant à la structure macro- ou microscopique des Aphyllophorales sont indiquées et très souvent illustrées, avec référence à un genre ou une espèce, ce qui ajoute évidemment à la précision dans l'énumération des caractéristiques de ces taxons. Deux clés de détermination des genres sont suivies par la description des espèces présentées selon l'ordre alphabétique des genres. Les diagnoses donnent toutes les informations indispensables habituelles, mentionnent également les synonymies, l'habitat, la répartition géographique et renvoient aux notes bibliographiques particulièrement abondantes qui, avec les index des noms génériques et spécifiques, terminent le volume.

Si le classement alphabétique facilite grandement la consultation de la flore, il ne rend pas compte des affinités présumées entre genres ou groupes de genres. C'est pourquoi les auteurs ont réalisé un schéma esquissant les liens de parenté concernant les champignons étudiés, mais dont ils demandent qu'on n'y voit pas un arbre phylogénétique et qu'ils regrettent d'avoir dû présenter selon deux dimensions. En effet, une disposition en plan ne permet guère de souligner clairement les alliances dans différentes directions qu'offrent certains

genres ni de montrer combien sont parfois mal définies les séparations entre familles voisines. De tels inconvénients obligés n'enlèvent cependant rien à l'intérêt de cet essai systématique qui situe par rapport à l'ensemble des Aphyllophorales des genres réunis peut-être un peu artificiellement d'après leur morphologie, pour cette étude.

Autant par l'apport descriptif qu'il représente que par la valeur des nombreuses indications apportées au sujet des Aphyllophorales résupinés et non porés d'Amérique du Nord d'Europe et d'U.R.S.S., cet ouvrage apparaît comme un bon instrument de travail pour la reconnaissance des espèces, mais aussi pour l'établissement d'utiles comparaisons avec la flore d'Aphyllophorales d'autres régions du globe, notamment tropicales.

J. Perreau

PESSON P., 1980 — Actualités d'écologie forestière, sol, flore, faune. Formation permanente en écologie et en biologie. Gauthiers-Villars, Paris, 517 p.

Cet ouvrage collectif (le huitième de la collection), présente quelques uns des aspects majeurs des écosystèmes forestiers. Leur complexité apparaît à la lecture d'une succession d'articles rédigés par des botanistes, des microbiologistes, des zoologistes, des pédologues, tous écologistes appartenant aux plus importantes institutions françaises d'Enseignement et de Recherche.

Ce livre, abondamment illustré de cartes, graphiques, photographies, schémas remarquablement exécutés, et d'une planche en couleurs, se divise essentiellement en trois parties. Dans la première, qui est fondamentale, sont groupés des articles traitant des litières forestières provenant d'une matière organique fraîche et périodiquement renouvelée qui se trouve décomposée, en des temps variables, sous l'effet de cycles biogéochimiques complexes, pour aboutir à la construction de l'humus. Une telle transformation subit des fluctuations multiples, souvent désordonnées, parmi lesquelles on considère celles liées à la nature de la litière, au climat, au sol, à la station, à la microflore et la microfaune, dont les actions se succèdent et interfèrent.

La seconde partie traite de questions d'écologie végétale et de sylviculture, telles que la biogéographie des Conifères méditerranéens, leurs exigences géomorphologiques, édaphiques ou bioclimatiques. Il en est de même pour le hêtre. Sont ensuite exposées des données importantes concernant les méthodes d'évaluation de l'évapotranspiration. Ces considérations conduisent à sensibiliser le lecteur sur les difficiles problèmes que doit résoudre le sylviculteur pour aboutir au choix judicieux d'une essence adaptée et économiquement rentable.

Dans la troisième partie sont évoqués les rôles de prédateurs que jouent les habitants de la forêt : oiseaux, mammifères, reptiles ainsi que la multitude des invertébrés. On peut, dans cette partie de l'ouvrage, regretter l'absence d'un rappel des déprédations causées aux forêts par les champignons lignicoles : pourridiés, espèces lignivores, etc..., dont les effets destructeurs sont souvent économiquement très importants.

Ce livre participe pleinement à rétablir la vraie définition de l'écologie. En même temps il en montre l'importance et les objectifs.

G. Viennot-Bourgin

RAIMBAUD M., 1981 – Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. Travaux et documents de l'O.R.S.T.O.M. n° 127, O.R.S.T.O.M. Paris, 291 p.

L'objectif de ce travail est la mise au point d'un procédé de culture aérobie de champignons filamenteux sur des milieux naturels concentrés, permettant de transformer des substrats agricoles pauvres en protéines en aliments fermentés propres à la consommation animale. Le modèle retenu pour l'expérimentation est un substrat amylacé, le manioc, et sa transformation par une souche d'*Aspergillus niger (f. hennebergii)* remarquable par ses performances amylolytiques.

Après avoir précisé l'influence des facteurs de l'environnement et déterminé ainsi les conditions optimales de culture, l'auteur analyse méthodiquement le mode de colonisation du substrat par le mycélium et les caractéristiques biochimiques de la fermentation. L'étude cinétique des paramètres de la fermentation solide : biosynthèse du matériel cellulaire, métabolisme respiratoire, métabolisme de l'eau, production de chaleur, conduit à l'élaboration d'un modèle cinétique de la croissance fongique en milieu solide, qui trouve son application dans la mise au point d'une unité pilote de fermentation. Les résultats exposés (obtention, à partir du manioc, d'un produit fermenté contenant 18 % de protéines) montre tout l'intérêt qu'il y a à poursuivre les recherches fondamentales dans le domaine des croissances fongiques sur des substrats solides naturels.

J. Nicot

COLEY-SMITH J.R., VERHOEFF K. and JARVIS W.R., 1981 – The biology of *Botrytis*. Academic Press, London. 318 p.

Les *Botrytis* sont des champignons des régions tempérées connus depuis longtemps pour leur pouvoir pathogène et ses incidences économiques. Leur importance se reflète dans le nombre considérable de travaux publiés, tant au plan fondamental qu'appliqué. Un groupe européen de chercheurs sur les *Botrytis* s'est même créé et se réunit régulièrement depuis 1964. La diversité des domaines de recherche et la profusion des données bibliographiques nécessitaient une mise au point sur l'état actuel des connaissances en matière de biologie des *Botrytis*. L'ouvrage qui nous est proposé ici constitue cette synthèse. C'est avant tout un livre de biologie, l'aspect phytosanitaire étant réservé au chapitre final intitulé «Disease control».

Les 5 premiers chapitres portent sur la taxonomie, la morphologie, la structure et le comportement en culture et dans la nature des conidies, des sclérotes et du téléomorphe *(Botryotinia)*. Ils constituent ce que nous appellerons une

première partie tandis que les processus d'infection, les relations hôtes-parasites, les mécanismes de résistance et l'épidémiologie peuvent être regroupés en une seconde partie. Enfin, le rôle particulier et complexe de *Botrytis cinerea* dans le domaine de l'œnologie est traité dans un chapitre à part.

Contrairement aux autres ouvrages de ce type, rédigés par plusieurs spécialistes, et qui manquent parfois de cohésion, «The Biology of *Botrytis*», par l'unité du matériel fongique qui y est traité, constitue un ensemble dont la lecture et l'utilisation sont aisées. Cette spécificité ne limite absolument pas la portée de l'ouvrage qui présente un intérêt incontestable au plan général de la biologie des champignons. A ce titre il constitue, pour un large public de chercheurs non limité aux phytopathologistes, une source précieuse d'informations.

M.F. Roquebert

BALDWIN R.S., 1981 – The fungus fighters. Two women scientists and their discovery. Cornell University Press, Ithaca and London, 212 p.

A travers la biographie de deux chercheurs dont les travaux conjugués ont conduit à la découverte de la nystatine l'auteur, journaliste, révèle les activités multiples d'une équipe de recherche médicale aux États-Unis. Une démarche exemplaire conduit des travaux désintéressés d'une microbiologiste et d'une chimiste à la mise au point expérimentale du premier antibiotique antifongique appliquable aux mycoses humaines, puis à sa commercialisation et enfin à l'autofinancement de la recherche fondamentale et au mécénat. Au fil de ce fascinant reportage, le lecteur glane une foule d'informations sur les mycoses, sur les usages médicaux et paramédicaux de la nystatine, et sur la stratégie de la recherche médicale aux U.S.A.

J.Nicot

SIVANESAN A., 1981 – *Balladinopsis, Balladynocallia* and *Alina*. Mycological Papers n° 146, C.M.I. Ed., Kew. 38 pages, 8 planches, 19 figures.

12 espèces de *Balladinopsis* sont décrites et illustrées de figures au trait ou de planches photo. 3 espèces nouvelles: *B. ebbelsii*, *B. johnstonii* et *urtiagae* sont décrites, toutes trois ayant une anamorphe appartenant au genre *Tetraspora*. La systématique du genre *Balladynocallia* (3 espèces) est revue et discutée.

M.F. Roquebert

TABLES DU TOME 2 - 1981



NOTE :

Il est rappelé aux abonnés qu'ils doivent règler leurs abonnements avant la fin du premier semestre de l'année en cours.

Dépôt légal n° 11207 - Imprimerie de Montligeon
Sorti des presses le 28 février 1982

ABONNEMENTS A CRYPTOGAMIE - MYCOLOGIE

Tome 3, 1982

France . . . . 170 F
Étranger . . . . 200 F

REVUE DE MYCOLOGIE

Prix des Tomes 1 à 43 :	France : 120 F	Étranger : 130 F
Collections complètes :	réduction de 20 % par tome.	
Prix du fascicule séparé :	France : 35 F	Étranger : 45 F

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE

Prix des Tomes 1 et 2 :	France : 170 F	Étranger : 200 F
Prix du fascicule séparé :	France : 50 F	Étranger : 60 F

MÉMOIRES HORS-SÉRIE DISPONIBLES

N° 2 (1942). Les matières colorantes des champignons, par I. Pastac. 88 pages : 15 F.

N° 3 (1943). Les constituants de la membrane chez les champignons par R. Ulrich. 44 pages : 15 F.

N° 6 (1958). Essai biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés par J. Boidin. 390 pages, pl. et fig. : 70 F.

N° 7 (1959). Les champignons et nous (Chroniques) (II), par G. Becker. 94 pages : 25 F.

N° 8 (1966). Catalogue de la Mycothèque de la Chaire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. (I) Micromycètes, Macromycètes (première partie). 68 pages : 25 F.

N° 9 (1967). Table des Matières (1936-1965) 85 p. 20 F. – (1966-1975) 40 p. 10 F.

N° 10 (1969). Le genre Panaeolus. Essai taxinomique et physiologique, par G.-M. Ola'h. 273 pages, pl. et fig. : 75 F.

FLORE MYCOLOGIQUE DE MADAGASCAR ET DÉPENDANCES,

publiée sous la direction de M. Roger HEIM.

Tome I. Les Lactario-Russulés, par Roger HEIM (1938) *(épuisé)*.

Tome II. Les Rhodophylles, par H. Romagnesi (1941), 164 pages, 46 fig. : 60 F.

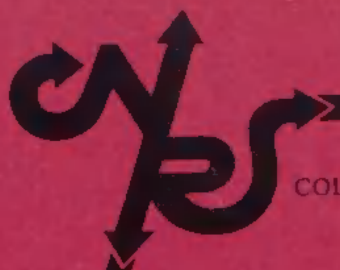
Tome III. Les Mycènes, par Georges Métrod (1949). 144 pages, 88 fig. : 60 F.

Tome IV. Les Discomycètes de Madagascar, par Marcelle Le Gal (1953). 465 pages, 172 fig. : 90 F.

Tome V. Les Urédinées, par Gilbert Bouriquet et J. P. Bassino (1965). 180 pages, 97 fig., 4 pl. hors-texte : 60 F.

Règlements :

– *par virement postal au nom de Cryptogamie - Revue de Mycologie 12, rue de Buffon, 75005 PARIS, C.C.P. PARIS 6 193 02 K;*
– *par chèque bancaire établi au même ordre.*



COLLOQUE INTERNATIONAL
du CNRS N° 258

**ÉCHANGES IONIQUES TRANSMEMBRANAIRES
CHEZ LES VÉGÉTAUX
TRANSMEMBRANE IONIC EXCHANGES IN PLANTS**

org. : G. Ducet, R. Heller, M. Thellier
Universités de Rouen et Paris VII - 5-11 juillet 1976

■ analyse des modèles théoriques ■ recherche des couplages métaboliques ou autres ■ études électrophysiologiques ■ cas particulier des transferts d'anions et de molécules organiques ■ localisation d'ions et aspects structuraux et moléculaires ■ intervention d'échanges ioniques dans les régulations intercellulaires

- kinetic and thermodynamic considerations, model systems
- metabolic and other couplings, ATPases
- particular features of anionic transfers
- electrophysiology of the ionic transfer
- absorption of organic molécules
- localization, molecular and structural aspect of the transfers
- interference of the transmembrane transfers in other processes than absorption
- ion exchanges in cell organites

(69 communications dont 64 en anglais et 5 en français)

21 × 29, 7 - 608 pages - broché
286 fig. - 89 tabl. - 30 phot.
ISBN 2-222-02021-2
(co-édition CNRS-Université de Rouen)

180 F

Editions du CNRS
15 quai Anatole France. 75700 Paris

CCP Paris 9061-11 - Tel 555.92.25

M.____________
profession ____________
adresse ____________
achète le livre ____________

chez son libraire ☐
à défaut aux Editions du CNRS (chèque joint) ☐
et demande votre documentation
☐ Sciences humaines
☐ Sciences exactes et naturelles
☐ Trésor de la langue Française
☐ Revue de l'Art